

**In-vitro-Untersuchung eines Zellmodells für die  
Entwicklung von Sonden in der molekularen Bildgebung  
und Therapie:  
Expression endothelialer Marker in einer Endothelzelllinie**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Juliane Keil  
geboren am 01.11.1976 in Leipzig**

- 1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Ingrid Hilger, Jena**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dietmar Gottschild, Jena**
- 3. Gutachter: Prof. Dr. med. Peter Stiehl, Leipzig**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 25. Oktober 2004**

## Abkürzungsverzeichnis

### Fachausdrücke und Einheiten

%	Prozent
$\lambda_{\text{Absorption}}$	Absorptionswellenlänge
$\lambda_{\text{Emission}}$	Emissionswellenlänge
°C	Grad Celsius
$\alpha$	Irrtumswahrscheinlichkeit
ANOVA	analysis of variance
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
bFGF	basal fibroblast growth factor
BP	Blockpuffer
BSA	bovine serum albumine
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium-Ionen
CD	cluster of differentiation
$\text{Cl}^-$	Chlorid-Ionen
$\text{cm}^2$	Quadratzentimeter
$\text{CO}_2$	Kohlendioxid
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indolx2HCl p.A.
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleid acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunabsorbant assay
et al.	und andere
FACS	Fluorescence associated cell sorting
FGF-2	fibroblast growth factor 2
FL-1	Fluoreszenz 1
FSC	forward scatter/ Vorwärtsstreulicht
<b>g</b>	Gramm
G	Gelatine
GT	Gelatine mit Trockenschränkinubation
<b>h</b>	Stunden
H+L	heavy and light
H-2K	histocompatibility 2, K-region
HDME-Zellen/ HDMEC	human dermal microvascular endothelial cells

Her-2	Herzeptin-2/ neu
HUVE-Zellen/ HUVEC	humane umbilicale Venenendothelzellen
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IgG/ IgG <sub>1</sub>	Immunglobulin G/ Immunglobulin G <sub>1</sub>
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL-4	Interleukin 4
K1	Kontrolle 1
K2	Kontrolle 2
K <sub>a</sub>	Assoziationskonstante
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
Konz.	Konzentration
l	Liter
LDL	low density lipoprotein
LSD	least significant difference
M	Molare Masse
m	Meter
MACS	magnetic cell sorting and separation
MAdCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule-1
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ionen
MHC I	main histocompatibility complex 1
min	Minute
mol	Mol
mRNA	messenger ribonucleid acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	magnetic seperation
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ionen
NB	narrow band
NF $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
P	Poly-L-Lysin
p	bedingte Wahrscheinlichkeit
PB	phosphat buffer
PBS	phosphat buffered saline
PBS+M	phosphat buffered saline mit zweiwertigen Ionen
PECAM-1	plateled endothelial cell adhesion molecule-1
pH	pH-Wert
PT	Poly-L-Lysin mit Trockenschränkinkubation
rpm	rotations per minutes

<b>s</b>	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SP	Separationspuffer
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SSC	side scatter/ Seitwärtsstreulicht
SV40	simian virus 40
SVE4-10-Zellen/ SVEC4-10	simian virus 40 transformierte Endothelzellen
TGF $\beta$	tumor growth factor $\beta$
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
<b>U</b>	units
UN	unbeschichtet
VCAM-1	vascular cellular adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
WP	Waschpuffer
WU	wide band

### Vorsätze bei Größeneinheiten

k	Kilo	(10 <sup>3</sup> )
c	Zenti	(10 <sup>-2</sup> )
m	Milli	(10 <sup>-3</sup> )
$\mu$	Mikro	(10 <sup>-6</sup> )
n	Nano	(10 <sup>-9</sup> )
p	Piko	(10 <sup>-12</sup> )

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN.....</b>	<b>21</b>
3.1	SUBSTANZEN.....	21
3.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	23
3.3	GERÄTE .....	24
<b>4</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>26</b>
4.1	CHARAKTERISIERUNG DER ZELLINIE SVEC4-10 .....	26
4.2	ZELLKULTUR .....	26
4.2.1	<i>Auftauen und Kultivieren von Zellen .....</i>	<i>26</i>
4.2.2	<i>Passagieren von Zellen.....</i>	<i>27</i>
4.2.3	<i>Zellzahlbestimmung .....</i>	<i>28</i>
4.2.4	<i>Einfrieren von Zellen .....</i>	<i>28</i>
4.3	VORUNTERSUCHUNGEN ZUR REZEPTORMARKIERUNG .....	29
4.3.1	<i>Mykoplasmentest.....</i>	<i>29</i>
4.3.2	<i>Ermittlung der optimalen Aussaatzellzahlen für verschiedene Wachstumszeiten.....</i>	<i>30</i>
4.3.3	<i>Optimierung der Zelladhäsion für die Untersuchungen am ELISA-Reader durch Variation von Waschpuffer und Wachstumsmatrix .....</i>	<i>31</i>
4.4	UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION DER OBERFLÄCHENREZEPTOREN CD106, CD105 UND CD31 AUF TNF $\alpha$ -STIMULIERTEN SVE4-10-ZELLEN.....	35
4.4.1	<i>Untersuchungen am ELISA-Reader zur Expression von CD106, CD105 und CD31 auf SVE4-10-Zellen nach Simulation mit TNF<math>\alpha</math>.....</i>	<i>36</i>
4.4.2	<i>Untersuchungen der TNF<math>\alpha</math>-stimulierten CD106-Expression..... auf SVE4-10-Zellen im Flow-Cytometer (FACS-Analyse).....</i>	<i>40</i>
4.4.3	<i>Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD106 in SVE4-10-Zellen nach Stimulation mit TNF<math>\alpha</math>.....</i>	<i>42</i>
4.5	ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER NACHWEIS SPEZIFISCH AN SVE4-10-ZELLEN GEKOPPELTER NANOPARTIKEL.....	43

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>45</b>
5.1	ERGEBNISSE DER VORUNTERSUCHUNGEN ZUR REZEPTORMARKIERUNG.....	45
5.1.1	<i>Mykoplasmentest.....</i>	<i>45</i>
5.1.2	<i>Ermittlung der optimalen Aussaatzellzahlen für verschiedene Wachstumszeiten.....</i>	<i>46</i>
5.1.3	<i>Variation von Waschpuffer und Wachstumsmatrix zur Optimierung der Zelladhäsion für die Messungen am ELISA-Reader.....</i>	<i>49</i>
5.2	ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN AM ELISA-READER ZUR EXPRESSION VON CD106, CD105 UND CD31 AUF SVE4-10-ZELLEN NACH STIMULATION MIT TNF $\alpha$ . 52	52
5.3	ERGEBNISSE DER FLOWCYTOMETRISCHEN UNTERSUCHUNG DER CD106-EXPRESSION AUF SVE4-10-ZELLEN NACH STIMULATION MIT TNF $\alpha$ .....	62
5.3.1	<i>Stimulation mit 5 ng/ml TNF<math>\alpha</math>.....</i>	<i>62</i>
5.3.2	<i>Stimulation mit 50 ng/ml TNF<math>\alpha</math>.....</i>	<i>66</i>
5.4	ERGEBNISSE DER FLUOROMETRISCHEN UNTERSUCHUNGEN DER BEIDEN UNABHÄNGIGEN METHODEN.....	70
5.5	ZYTOTOXISCHE WIRKUNG VON TNF $\alpha$ .....	70
5.6	ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN DARSTELLUNG DER EXPRESSION VON CD106 AUF SVE4-10-ZELLEN NACH STIMULATION MIT TNF $\alpha$ .....	71
5.7	ERGEBNISSE DER SPEZIFISCHEN BINDUNG EINER MODELLSONDE (MAGNETISCHE NANOPARTIKEL) AN DEN CD106-REZEPTOR STIMULIERTER SVE4-10-ZELLEN .....	73
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
6.1	DISKUSSION DER PARAMETEROPTIMIERUNG ZUR REZEPTORUNTERSUCHUNG .....	77
6.1.1	<i>Untersuchung der Zellkultur auf Sterilität.....</i>	<i>77</i>
6.1.2	<i>Ermittlung der optimalen Aussaatzellzahlen für verschiedene Wachstumszeiten.....</i>	<i>78</i>
6.1.3	<i>Variation von Waschpuffer und Wachstumsmatrix zur Optimierung der Zelladhäsion in den Messungen am ELISA-Reader.....</i>	<i>80</i>
6.2	DISKUSSION DER AM ELISA-READER UNTERSUCHTEN EXPRESSION VON CD106, CD105 UND CD31 AUF SVE4-10-ZELLEN NACH SIMULATION MIT TNF $\alpha$ .....	83
6.3	DISKUSSION DER IM FLOW-CYTOMETER UNTERSUCHTEN TNF $\alpha$ -STIMULIERTEN CD106-EXPRESSION AUF SVE4-10-ZELLEN .....	88
6.4	VERGLEICH DER FLUORESCENZDETEKTIONSMETHODEN .....	92
6.5	ZYTOTOXISCHE WIRKUNGEN VON TNF $\alpha$ .....	95

---

6.6	ANKOPPLUNG EINER MODELLSONDE AN STIMULIERTE SVE4-10-ZELLEN.....	99
7	SCHLUSSFOLGERUNG .....	102
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	104
9	DANKSAGUNG	
10	LEBENS LAUF	
11	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	



## 1 Zusammenfassung

Die heute etablierten Verfahren der Tumordiagnostik beruhen vorrangig auf der Darstellung grober anatomischer und physiologischer Gegebenheiten des Gewebes. Mit zunehmenden molekularbiologischen Kenntnissen über Tumorzellen und tumorversorgende Endothelzellen (kurz: Tumorendothelzellen) wird jedoch eine Verfeinerung der Diagnostik angestrebt. Besonders die Tumorendothelzellen bieten dabei – aufgrund ihrer zentralen Rolle für den Tumor und ihrer besonderen Charakteristika – Ankerstrukturen zur Tumorerkennung und Angriffsmöglichkeiten zur Tumorthherapie. Dazu sollen spezifische Sonden, bestehend aus Antikörpern gegen spezifische Proteine und diagnostischen Markern, im Tumorareal selektiv angereichert werden. So können hochspezifische Proteine auf der Oberfläche tumorversorgender Endothelzellen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip genutzt werden. Ähnliches wird auch für therapeutische Agentien untersucht. Um diese Sonden und ihre Detektierbarkeit beziehungsweise ihre therapeutische Wirksamkeit untersuchen zu können, sind Zellmodelle notwendig, an deren Oberfläche spezifische Rezeptoren in größerer Zahl exprimiert werden. Als solche dienen bisher vorrangig primäre Zellkulturen. Da diese eine geringe Konstanz der charakteristischen Eigenschaften besitzen und zudem eine aufwändige Zellgewinnung und -kultivierung erfordern, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Modell einer permanenten Zelllinie erarbeitet. Die transformierte, murine Endothelzelllinie SVEC4-10 wurde – auch im Hinblick auf darauf aufbauende In-vivo-Experimente an Mäusen – dazu ausgewählt. An ihr wurde die Expression der allgemein auf Endothelzellen exprimierten Oberflächenproteine CD106, CD105 und CD31 unter systematischer Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  untersucht. Dafür erfolgte nach jeweils 4, 12, 24, 48 beziehungsweise 72ständiger Inkubation mit 0,05; 5 beziehungsweise 50 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  eine Markierung der Rezeptoren. Für die Markierung wurde das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz gewählt. Die Messung der Fluoreszenzen erfolgte zum einen im ELISA-Reader, zum anderen anhand der FACS-Analyse.

In Voruntersuchungen wurde die Sterilität der Zellkultur anhand des DAPI-Tests überprüft.

Trotz der unterschiedlichen untersuchten Inkubationszeiten mit  $\text{TNF}\alpha$  sollten annähernd gleich konfluente Zellteppiche am Ende der Inkubationszeit markiert werden. Aus diesem Grund wurden für die verschiedenen Inkubationszeiten entsprechende Aussaatzellzahlen ermittelt.

Des weiteren wurden die optimalen Adhäsionsbedingungen für SVE4-10-Zellen während der Fluoreszenzmarkierung im ELISA-Reader untersucht. Dies erfolgte anhand mikroskopischer Beobachtungen und einer anschließenden Lebendzellzahlbestimmung. Es wurden die Gelatinebeschichtung mit anschließender Trockenschrankinkubation als Wachstumsmatrix und DMEM als optimaler Waschpuffer ermittelt.

Die Untersuchung der Oberflächenrezeptoren ergab nur für CD106 eine gesteigerte Expression unter Stimulationsbedingungen. Für die Rezeptoren CD105 und CD31 wurde keine vermehrte Expression nachgewiesen. Als optimal für die Stimulation des CD106-Rezeptors auf SVE4-10-Zellen erwies sich dabei die 24stündige Stimulation mit 50 ng/ml TNF $\alpha$ . Diese Parameter beruhen auf Ergebnissen der FACS-Analyse, welche eine klare Dynamik der CD106-Expression über verschiedene TNF $\alpha$ -Konzentrationen und Inkubationszeiten erkennen ließen. Im Vergleich dazu waren die Daten der Messung im ELISA-Reader aufgrund einer großen Hintergrundfluoreszenz weniger aussagekräftig. Anhand der Ergebnisse der FACS-Analyse und unter Berücksichtigung der zytotoxischen Wirkungen von TNF $\alpha$  wurde dem Zellmodell eine Stimulation der SVE4-10-Zellen mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  über 24 h zu Grunde gelegt. Mit einer großen Anzahl hochspezifischer, identischer Ankerpunkte in Form von CD106-Rezeptoren wurde mit diesem Zellmodell ein *neues Werkzeug* zur Sondenerprobung in der In-vitro-Forschung entwickelt.

Exemplarisch wurde die Anwendung dieses Zellmodells anhand einer hochspezifischen CD106-vermittelten Ankopplung magnetischer Nanopartikel gezeigt. Dabei wurden neben den spezifischen Anlagerungen auch Internalisierungen der Nanopartikel beobachtet, wodurch eine Signalamplifikation ermöglicht werden könnte. Unspezifisch angelagerte Nanopartikel wurden nicht internalisiert. Die somit nachgewiesene Möglichkeit der hochspezifischen Anlagerung magnetischer Nanopartikel an Zellen zeigt neue Ansätze in der MRT-Diagnostik auf.

Mit der erfolgreichen Anwendung des Zellmodells der TNF-stimulierten permanenten Endothelzelllinie SVEC4-10 zeigt sich dieses als Baustein im jungen, emporstrebenden Gebiet des *molekularen Targeting*. Das Zellmodell steht somit als *leicht handhabbares Werkzeug* zur In-vitro-Entwicklung einer breiten Palette diagnostischer oder therapeutischer Sonden zur Verfügung.

## 2 Einleitung

Als zweithäufigste Todesursache in Deutschland sind die malignen Tumoren in den letzten Jahrzehnten in das Zentrum der medizinischen Forschung gerückt. Die malignen Tumoren sind definiert als „Gewebe mit ungehemmter und unkontrollierter Zellteilung sowie infiltrativem, destruierendem und metastasierendem Wachstumscharakter“ [ERBAR 2000, S. 1]. Den Organismus schädigen sie durch Verdrängung und Zerstörung gesunden Gewebes, sowie durch Eingriffe in den Stoffwechsel beziehungsweise in die hormonellen Regelkreise. Diesem malignen Wachstum liegen zumeist DNA-Schäden (unter anderem Transformationen) zu Grunde.

Der Körper ist durch verschiedene Mechanismen in der Lage, diese maligne transformierten Zellen zu erkennen und zu vernichten. Die körpereigene Abwehr kann somit eine Tumorentstehung verhindern. Dazu stehen grundsätzlich zwei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen sind in jeder Zelle Enzyme vorhanden, die Veränderungen der DNA sofort korrigieren beziehungsweise eliminieren können. Zum anderen ist eine Zerstörung transformierter Zellen durch T- und B-Lymphozyten sowie durch Makrophagen bekannt [ERBAR 2000]. Sind die intrazellulären und immunologischen Mechanismen des Körpers nicht ausreichend, maligne transformierte Zellen zu vernichten, bleiben diese Tumorzellen bestehen und vermehren sich.

Für Tumorzellen postulierte Paul Ehrlich mit den „magic bullets“ Anfang des 20. Jahrhunderts bereits die Andersartigkeit der Oberfläche. Auf dieser werden ein oder mehrere spezifische Tumorantigene vermehrt exprimiert, welche die Tumorzellen deutlich von gesunden somatischen Zellen unterscheiden. Diese Antigene sind in geringer Zahl zumeist auch auf benignem Gewebe vorhanden, werden jedoch auf Tumorzellen wesentlich stärker exprimiert. Diese Tumorantigene werden bereits als Angriffspunkt für die antitumorale Therapie genutzt. Einige Ansätze hierfür finden sich in der Anwendung unkonjugierter oder konjugierter monoklonaler Antikörper zur Zerstörung des Tumors. Doch diese Therapieverfahren weisen grundsätzliche Nachteile auf: Die Antikörper dringen nur schwer in das Zielgewebe vor und verteilen sich dadurch sehr inhomogen im Tumor. Somit sind diese Therapieansätze nur zur Behandlung minimaler residueller Erkrankungen geeignet und lassen nach weiteren Therapiemöglichkeiten suchen [SCHEULEN et al. 2003].

Die vermehrte Gefäßversorgung ist ein weiteres Charakteristikum, in welchem sich die malignen Tumoren – neben der spezifischen Zelloberfläche – wesentlich von gesunden Geweben unterscheiden. Diese erhöhte Vaskularisierung – durch Angiogenese entstehend – ist grundlegende Voraussetzung zur Sicherstellung des erhöhten Sauerstoff- und Nährstoffbedarfes im schnellwachsenden malignen Gewebe.

Die Rolle der Angiogenese erkennend, stellte Folkman 1971 die Hypothese auf, dass die lokale Ausbreitung der maligne transformierten Zellen – und somit das Tumorwachstum – durch die Vaskularisierung limitiert ist [FOLKMAN 2000]. Damit eröffnete er ein völlig neues Gebiet der Tumorforschung, zu dem nunmehr jährlich eine kaum überschaubare Zahl an Veröffentlichungen erscheint.

Grundsätzlich sind Tumorzellen in der Lage, endothelzell-stimulierende Faktoren freizusetzen und dadurch die Bildung des eigenen Gefäßsystems voranzutreiben. HORI et al. und KIM et al. beobachteten in vivo an Mäusen unter Antikörpergabe gegen bFGF beziehungsweise VEGF – beides Mediatoren der Angiogenese – eine Hemmung des Tumorwachstums, die in In-vitro-Versuchen an isolierten Tumorzellen nicht festgestellt werden konnte [HORI et al. 1991; KIM et al. 1993]. Sie führten das reduzierte Tumorwachstum auf die Hemmung der Angiogenese zurück und bestätigten somit die Hypothese von Folkman.

Der Tumor ist jedoch nicht nur passiv abhängig von der Gefäßversorgung. Er ist auch in der Lage, Endothelzellen so zu stimulieren, dass sie ihn nicht nur versorgen, sondern seine Ausbreitung durch weitere Faktoren begünstigen. So wurde neben dem bereits erwähnten Tumorzelleinfluss auf das Endothelzellwachstum eine tumorinduzierte Stimulation der Endothelzellen zur Abgabe chemoattraktiver Substanzen für Tumorzellen festgestellt [RAK et al. 1995]. Ferner sind die Endothelzellen als Syntheseort zahlreicher mitogener und antiapoptotischer Faktoren bekannt [RAK et al. 1995].

Die Gefäßversorgung des Primärtumors ist auch im Zusammenhang mit der gefürchteten Ausbreitung maligner Tumoren auf andere Körperregionen zu betrachten [GASPARINI et al. 1994]. In den somit entstehenden Metastasen bleiben die Charakteristika der Tumorzellen erhalten. Eine Korrelation der erhöhten Vaskularisierung des Tumors mit seiner Fähigkeit Metastasen zu bilden, ist trotz kritischer Diskussionen [VAN HOEF et al. 1993; GOULDING et al. 1995] sehr wahrscheinlich [GASPARINI et al. 1994].

Vermutungen von FOLKMAN sprechen für diese Korrelation [FOLKMAN 1994]. Dabei beruhen sie unter anderem auf dem Heterogenitätsmodell des Tumors, was die gemeinsame Existenz sowohl angiogenese-stimulierender als auch nicht-angiogenese-stimulierender

Zellen innerhalb eines Tumors voraussetzt. FOLKMAN spricht dabei von einem vergleichsweise erhöhten Metastasierungsrisiko durch Abgabe angiogenese-stimulierender Tumorzellen gegenüber der Abgabe nicht-angiogenese-stimulierender Tumorzellen in die Blutbahn [FOLKMAN 1994]. Des weiteren tritt bei verstärkter Vaskularisierung des Tumors eine Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Tumor und Blut auf. Dabei erhöht sich die Wahrscheinlichkeit des Tumorzelleintritts in die Zirkulation des Blutkreislaufes und kann somit zur beobachteten Korrelation zwischen Tumorvaskularisierung und Metastasierung beitragen [LIOTTA et al. 1974].

Auch weitere Eigenschaften des Tumors, wie die Invasionsfähigkeit in die Blutgefäße und die unter anderem oberflächenvergrößernde Neovaskularisation – welche klar voneinander zu trennen sind [GOULD und KRAFT 1983; KATO et al. 2003] – stehen im Zusammenhang mit dem Metastasierungsrisiko. Diese Interaktionen wurden in einer Studie an über 500 Patientinnen mit Brustkrebs genauer untersucht. Der Quotient aus durchschnittlicher Gefäßanzahl (average microvessel density) und histologisch beurteilter Blutgefäßinvasion des Tumors wurde als verlässlichster Prognosefaktor für Aussagen zur rückfallfreien 20-Jahres-Überlebensrate und zur 20-Jahres-Überlebensrate ermittelt. Er erwies sich in dieser Studie als aussagekräftiger als der Lymphknotenstatus [KATO et al. 2003].

Die Angiogenese spielt somit eine zentrale Rolle im Prozess der Tumorentwicklung. Dies wird sowohl durch die Abhängigkeit des Primärtumorstwachstums von der Angiogenese als auch durch die Korrelation von Metastasierung und Vaskularisierung des Tumors deutlich. Daher ist es sinnvoll, die Angiogenese für weitere Entwicklungen in Diagnostik und Therapie heranzuziehen.

Es werden dazu zwei grundlegend verschiedene Ansätze der Tumornekrose deutlich. Beide basieren auf der Störung der Vaskularisierung durch Angriff der tumorversorgenden Endothelzellen (kurz: Tumorendothelzellen).

Zum einen wird versucht, durch einen *direkten Eingriff in das Regelwerk der Angiogenese* das Tumorstwachstum zu verhindern beziehungsweise eine Tumorregression anzustreben. Die Untersuchungen von RASTINEJAD et al., BOUCK und DAMERON et al. zu Grunde legend, erklärt FOLKMAN die Ausbildung des angiogenetischen Phänotypes damit, dass Veränderungen im Gleichgewicht der von Tumorzellen freigesetzten, hemmenden und aktivierenden angiogenetischer Faktoren auftreten [RASTINEJAD et al. 1989; BOUCK 1990; DAMERON et al. 1994; FOLKMAN 1995]. Im Rahmen solcher Überlegungen wurde durch die Hemmung von tumorigenen Angiogenesefaktoren [KIM et al. 1993], die Wirkung von

applizierten Angiogeneseinhibitoren [BOEHM et al. 1997] sowie die Rezeptorblockade angiogenetischer Faktoren auf Endothelzellen [MILLAUER et al. 1994] eine Verminderung des Tumorwachstums erreicht. Von besonderem Interesse sind dabei die Faktoren VEGF [MARTINY-BARON und MARME 1995], Angiogenin [OLSON et al. 1995] und FGF-2 [STAN et al. 1995], welche bereits in In-vivo-Experimenten erfolgreich beeinflusst wurden.

Eine zweite Möglichkeit besteht in der *Nutzung spezifischer Zielstrukturen* auf der Oberfläche von Tumorendothelzellen.

Diese tumorspezifischen Endothelzellen unterscheiden sich in einigen Charakteristika wesentlich von Endothelzellen gesunder Gewebe. So wird mit einer 20-2000fach gesteigerten Proliferationsrate eine starke Erhöhung des Stoffwechsels gegenüber Endothelzellen des gesunden Gewebes deutlich [DENEKAMP 1984]. Des weiteren sind eine erhöhte Permeabilität reifer Tumorgefäße im Vergleich zu normalen Endothelzellen [DVORAK et al. 1988] und eine reduzierte [BLOOD und ZETTER 1990] bis fehlende Basalmembran bekannt. Im Rahmen der Tumorentwicklung erfolgen weitere Veränderungen der Tumorendothelzellen und ihrer Eigenschaften. So kommt es bei Aktivierung angiogenese-stimulierender Zellen im Tumor zur Vermehrung der Endothelzellen und somit zur zunehmenden Vaskularisierung. Im Rahmen dieser Expression des angiogenetischen Phänotypes wird eine Proteinexpressionsveränderung auf der luminalen Membran der Endothelzellen beschrieben, welche im normalen Endothel nicht auftritt [WANG et al. 1993; FOLKMAN 1997]. Die Nutzung dieser spezifischen Oberflächenproteine der Tumorendothelzellen als Zielstruktur spezifisch wirkender Substanzen eröffnet völlig neue Möglichkeiten für eine hochspezifische Diagnostik und Therapie und wird durch weitere Eigenschaften dieser Zellen begünstigt.

Tumorendothelzellen besitzen eine erheblich größere genetische Stabilität als Tumorzellen. Damit besteht ein geringeres Risiko der Resistenzentwicklung gegenüber Medikamenten [FOLKMAN 1997], was einen großen Vorteil für den Einsatz von Therapeutika darstellt. Für den diagnostischen Bereich hingegen ist die bessere Zugänglichkeit der endothelialen Strukturen von besonderer Bedeutung. Sie ermöglicht eine homogenere Verteilung der diagnostischen und auch der therapeutischen Substanzen. Zudem ist keine transvasale Permeation dieser Substanzen notwendig, so dass der erhöhte Turgor des Tumorgewebes [JAIN 1989] keiner zusätzlichen Beachtung bedarf. Auch im therapeutischen Bereich spielt diese Tatsache eine nicht zu vernachlässigende Rolle.

Die Tumorendothelzelle lässt sich somit vor allem als spezifischer, genetisch stabiler, gut zugänglicher und sensibler Bestandteil des Tumors beschreiben, der für Diagnostik und Therapie interessante Ansätze bietet.

Die heute etablierten Diagnoseverfahren beruhen noch auf der Wahrnehmung grober, anatomischer oder physiologischer Informationen. Langfristig ist es jedoch möglich, sie durch die Darstellung molekularer Strukturen und Mechanismen nachhaltig zu verändern. Mit der Umsetzung dieser Vorstellungen befasst sich das auf In-vivo-Ebene sehr junge Forschungsgebiet der *molekularen Bildgebung*.

Eine erhebliche Zunahme der Spezifität diagnostischer Aussagen lässt sich prinzipiell für die Nuklearmedizin, die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie durch antikörper-gekoppelte methodenspezifische Marker voraussagen. So ist es beispielsweise möglich, durch Einsatz antikörper-gekoppelter paramagnetischer Substanzen den Informationsgehalt der Magnetresonanztomographie wesentlich zu steigern [SIPKINS et al. 1998; WEISSLEDER 2002]. In diesem Zusammenhang kann auch Licht zur Tumordiagnostik eingesetzt werden. NERI et al. führten dazu erste diagnostische Untersuchungen an Endothelzellen tumortragender Nacktmäuse unter Nutzung des nahen Infrarotbereiches durch. Sie nutzten eine Spleißvariante des onkofetalen Fibronektins als Target zur fluorophotometrischen In-vivo-Tumordetektion. Durch ein antikörper-gekoppeltes Fluorophor ließ sich der Tumor (bis auf geringe Fluoreszenzen im Femur) spezifisch detektieren [NERI et al. 1997].

Auch für den therapeutischen Einsatz spezifischer Marker auf Endothelzellen liegen erste Ergebnisse vor. So ist es möglich, den Antikörper gegen einen Oberflächenrezeptor mit einem gekoppelten zytotoxischen Agens als Sonde einzusetzen. In einem In-vivo-Versuch an brustkrebstragenden Mäusen wurde eine solche Sonde bereits erfolgreich angewendet [MATSUNO et al. 1999].

Die Tumorendothelzellen als Target diagnostischer und therapeutischer Substanzen ermöglichen einen völlig neuen Ansatz im Umgang mit malignen Tumoren. Bereits erwähnte, unterschiedliche Untersuchungen in diesem aufstrebenden Gebiet kennzeichnen das hohe Interesse an diesem Weg und den großen Bedarf an guten *Werkzeugen*.

Hintergrund der vorliegenden Arbeit ist vorwiegend ein therapeutischer Ansatz. Es handelt sich um ein Konzept des Institutes für Diagnostische und Interventionelle Radiologie Jena, welches eine innovative Therapie von Brustkrebstumoren verfolgt. Ziel ist es, eine Sonde mit

magnetischen Nanopartikeln zu entwickeln. Diese sollen an Endothelzellen der Tumorgefäße spezifisch binden und durch Anlegen eines äußeren Magnetwechselfeldes im Idealfall zur Erwärmung des Tumors führen. Bei ausreichend hohen Temperaturen kann es so zur Zerstörung der Tumorendothel- und Tumorzellen in Kombination mit klinischen onkologischen Verfahren kommen.

Es ist zu erwarten, dass in den kommenden Jahren weltweit die Forschungen auf diesem Gebiet weiter intensiviert werden, so dass sich die Notwendigkeit ergibt, geeignete *Werkzeuge* – dass heißt Zellmodelle – zu entwickeln.

Die Konzeption und Untersuchung von geeigneten, hochspezifischen Sondenmolekülen erfordert In-vitro-Experimente am Zellmodell. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis eines charakteristischen Ankers in Form spezifischer Proteine beziehungsweise Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Dieser Anker dient dem spezifischen Teil der Sonde, welche aus einem Antikörper und einem daran gekoppelten Marker beziehungsweise Therapeutikum besteht, zur spezifischen Anlagerung. Im Anschluss an die Bindung kann sowohl die Detektierbarkeit als auch die Wirksamkeit des antikörper-gekoppelten Agens geprüft werden.

In Abhängigkeit von der Fragestellung muss für jede Zelllinie dieser spezifische Anker neu etabliert und optimiert werden. Je häufiger das entsprechende Oberflächenprotein auf der Zelle exprimiert ist, desto besser lassen sich beispielsweise die Zellbeeinflussung durch die gebundenen Modellsonden sowie die Pharmakodynamik der spezifischen Sonden beobachten. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, das Expressionsverhalten der Oberflächenproteine sowie dessen Möglichkeiten der Manipulation, zum Beispiel durch Stimulation ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL1-}\beta$ ,  $\text{IL-4}$ , Lipopolysaccharide) zu untersuchen und gegebenenfalls zu nutzen.

Ebenso wie die Proteinexpression selbst, ist die Reaktion auf Stimulantien sowohl zelllinien- als auch protein- und stimulansspezifisch. Neben vermehrter Expression und Expressionshemmung durch Stimulantien wurden dabei auch Neusynthesen von Oberflächenproteinen beobachtet (zum Beispiel durch  $\text{TNF}\alpha$ ) [HOOGERWERF et al. 1995]. Das Verhalten von Oberflächenproteinen auf Endothelzellen unter Stimulationsbedingungen wurde bisher vor allem an humanen umbilicalen venösen Endothelzellen (HUVE-Zellen) [MONTGOMERY et al. 1991; SANO et al. 1994] und anderen primären Endothelzelllinien [STEWART et al. 1996] untersucht.

Primärkulturen bestehen aus Zellen, die fortwährend aus frischem Material isoliert werden müssen und somit für einmalige Untersuchungen gut geeignet sind. Bei kontinuierlicher Anwendung allerdings besteht der Nachteil der raschen Veränderung der Zelleigenschaften. So stellten beispielsweise UTOGUCHI et al. an primären Tumorendothelzellen fest, dass



bereits in der vierten Passage die tumorbedingten endothelialen Eigenschaften nicht mehr beobachtet werden konnten [UTOGUCHI et al. 1995]. Des weiteren ist bei der Kultivierung von Frischmaterial mit einer möglichen Keimbesiedlung zu rechnen, so dass der Einsatz von Antibiotika erforderlich ist. Grundsätzlich ist dabei ein Einfluss der Antibiotika auf die Ergebnisse nicht auszuschließen.

Zur Etablierung einer breiten Palette spezifischer Sonden bedarf es aber eines *leicht handhabbaren Werkzeuges*. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit eine permanente Endothelzelllinie untersucht. Dazu werden die simian virus 40 transformierten Endothelzellen (SVEC4-10) ausgewählt. Hierbei handelt es sich um eine transformierte, murine Zelllinie. Sie ist in ihrer morphologischen und funktionellen Charakteristik den normalen Endothelzellen zwar sehr ähnlich [O'CONNELL und EDIDIN 1990], kann jedoch in vivo zur Entwicklung karposisarkom-ähnlicher Tumore führen [O'CONNELL und RUDMANN 1993]. Für diese Zelllinie ist eine Konstanz aller initialen morphologischen Eigenschaften bis mindestens in die 40. Passage festgestellt worden [O'CONNELL und EDIDIN 1990].

Der Einsatz einer murinen Zelllinie erfolgt im Hinblick auf künftige Tierexperimente. Es ist dadurch möglich, auf In-vivo-Ebene definierte Bedingungen der speziesspezifischen tierexperimentellen Rahmenbedingungen wie zum Beispiel der Pharmakodynamik und der biologischen Wirkung der Sonden zu untersuchen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, in dieser Zelllinie SVEC4-10 durch Untersuchung ausgewählter Oberflächenproteine (hinsichtlich ihrer Eignung als Ankerstrukturen) das *geeignete, gut handhabbare Werkzeug* zur Sondenentwicklung zu finden.

Im Hinblick auf die spezifische Anbindung von hochspezifischen Sondenmolekülen ist es erforderlich, Zielstrukturen auf der Endothelzelloberfläche festzulegen. Aus der Vielfalt der Oberflächenproteine werden dazu im Rahmen dieser Arbeit drei Adhäsionsmoleküle ausgewählt. Alle drei werden unter anderem auf Endothelzellen exprimiert [TILL 1999].

Als erstes Oberflächenprotein wird der *Cluster of differentiation 106 (CD106)* ausgewählt, welcher auch als vascular-cell-adhesion-molecule-1 (VCAM-1) bekannt ist. Im Prozess der Metastasierung vermag CD106 Tumorzellen zu binden [WAGENER 1999]. Neben seinem Vorkommen auf Endothel- und Fibroblastenzellen [TILL 1999] sowie auf aktivierten zirkulierenden Endothelzellen [BERTOLINI 2002] ist seine Anwesenheit auf SVE4-10-Zellen nachgewiesen [ST LOUIS et al. 1993].

Als zweites Molekül für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wird der *Cluster of differentiation 105* (*CD105*, *Endoglin*) ausgewählt. Es handelt sich hierbei um ein Glycoprotein, das u.a. als Rezeptor für TGF $\beta$  dient. In vivo wird CD105 konstitutionell auf Endothelzellen exprimiert [GOUGOS et al. 1992]. Interessant ist die Beobachtung, dass CD105 zwar auch auf Endothelzellen im gesunden Gewebe exprimiert wird, jedoch beispielsweise wesentlich stärker auf Tumorendothelzellen in Ovarialkarzinomen auftritt [WANG et al. 1993]. Zudem wird der Rezeptor als proliferations-assoziiertes Antigen beschrieben [BODEY et al. 1998]. In weiterführenden Untersuchungen wurde sogar eine klare Korrelation zwischen der Expression von CD105 und anerkannten Proliferationsmarkern in Tumorendothelzellen beobachtet. Trotzdem erfolgte bisher keine Zuordnung zu den Proliferationsmarkern [MILLER et al. 1999]. Dessen ungeachtet wird CD105 als geeigneter Marker zur Quantifizierung angiogenetischer Endothelzellen mehrfach beschrieben [KUMAR et al. 1999; BREDOW et al. 2000]. Die verstärkte Expression von CD105 während der Proliferation von Tumorendothelzellen lässt eine Expression auf der potentiell tumorigenen Zelllinie SVEC4-10 vermuten. Zudem sind bereits erste tierexperimentelle Versuche mit spezifischen Sonden erfolgt, wobei CD105 als spezifischer Anker auf Tumorendothelzellen diene [MATSUNO et al. 1999].

Das dritte ausgewählte Oberflächenprotein, *Cluster of differentiation 31* (*CD31*), wird auch als Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1) bezeichnet. Als Adhäsionsmolekül ist es sowohl an Leucocyten-Endothel- als auch an Endothel-Endothel-Wechselwirkungen beteiligt [JANEWAY et al. 2002]. Es wird in verschiedenen Arbeiten zur Gefäßdarstellung im Tumor mit anschließender Quantifizierung eingesetzt [OLEWNICZAK et al. 2002; DESHPANDE et al. 2003; LORD et al. 2003; OLEWNICZAK et al. 2003]. Zudem ließ sich in CD31-defizienten Mäusen eine Verminderung der Angiogenese feststellen [SOLOWIEJ et al. 2003]. Jedoch erwies sich die Sensitivität von CD31 als Gefäßmarker im Vergleich zu CD105 in Untersuchungen am Endometriumkarzinom als wesentlich geringer [SAAD et al. 2003]. CD31 ist somit ein allgemeiner Endothelzellmarker.

Die Expression von CD31 auf proliferierenden und nicht-proliferierenden Endothelzellen sowie sein Einsatz als etablierter panendothelialer Marker [WANG et al. 1993] legt das Auftreten des Proteins auch auf der Endothelzelllinie SVEC4-10 nahe.

Als Stimulans für die ausgewählte Zelllinie SVEC4-10 wird der Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) aufgrund der zahlreichen beschriebenen Effekte auf primären Endothelzellen [VAN

KAMPEN und MALLARD 2001; SASAKI et al. 2002; WAGNEROVA et al. 2002] gewählt. TNF $\alpha$  ist ein trimeres Protein, das im Körper vor allem von Makrophagen produziert wird [TILL 1999]. Die Rezeptoren für TNF $\alpha$  befinden sich auf fast allen Zelltypen [TILL 1999] und konnten auch auf SVE4-10-Zellen nachgewiesen werden [SASAKI et al. 2002]. Sie interagieren mit einer sehr hohen Affinität ( $K_a = 2,5 \times 10^{-9}$  M) mit ihrem Liganden [IBELGAUFTS 1992]. Dadurch sind bereits bei geringen Konzentrationen deutliche Effekte zu erwarten. Von den vielfältigen bekannten Wirkungen des TNF $\alpha$  wird bei der Stimulation der SVE4-10-Zellen speziell der Einfluss auf die Proteinexpression genutzt. Aufgrund der Proteinabhängigkeit der Stimulationswirkung ist es allerdings notwendig, das Expressionsverhalten jedes einzelnen zu untersuchenden Oberflächenrezeptors zu betrachten.

Zur Ermittlung der optimalen Rezeptorexpression eines Endothelzellsystems bedarf es systematischer Stimulationsuntersuchungen. Entsprechende Versuchsreihen, in denen die *Konzentration* des Stimulans und die *Inkubationszeit* der Zellen mit dem Stimulans variiert werden, beschreiben die Kinetik einer Rezeptorexpression. Diese soll auf SVE4-10-Zellen unter dem Einfluss von TNF $\alpha$  für die drei ausgewählten Oberflächenrezeptoren erfasst werden. Eine solche systematische TNF $\alpha$ -Stimulation wurde bisher vor allem an Primärkulturen durchgeführt, zum Beispiel für das intercellular-adhesion-molecule-1 (ICAM-1) auf HUVE-Zellen [SANO et al. 1994]. Für permanente Endothelzelllinien sind systematische Stimulationsexperimente mit den ausgewählten Rezeptoren bisher nicht bekannt. In der Literatur werden nur definierte Parameterkombinationen genannt. Beispielsweise ist die Expression des mucosal-addressin-cell-adhesion-molecule-1 (MAdCAM-1) und CD106-Rezeptors auf SVE4-10-Zellen lediglich durch Stimulation mit 20 ng/ml TNF $\alpha$  über 24 h belegt [SASAKI et al. 2002; SASAKI et al. 2003]. Es ist aber nicht bekannt, in welcher Phase der Expressionskinetik sich der jeweilige Rezeptor befindet und inwieweit dieser Stimulationseffekt noch zu steigern ist. Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit eine systematische Untersuchung durchgeführt werden.

In diesem Rahmen ist es notwendig, Konzentrations- und Inkubationszeitreihen zur Stimulation der Oberflächenrezeptoren mit TNF $\alpha$  festzulegen.

Als erster variabler Parameter findet hierbei die einzusetzende Konzentration an TNF $\alpha$  Beachtung. Ziel bei der Auswahl der zu untersuchenden TNF $\alpha$ -Konzentrationen ist es, einen möglichst großen Bereich – von den ersten Stimulationseffekten bis hin zur Zytotoxizitätsgrenze – zu umfassen. Als Anhaltspunkte für wirksame TNF $\alpha$ -Konzentrationen dienen dabei

Studien anderer Arbeitsgruppen [SANO et al. 1994; ZAPOLSKA-DOWNAR et al. 2000; WAGNEROVA et al. 2002]. Die von SANO et al. an HUVE-Zellen eingesetzten Konzentrationen von 0,05; 5 und 50 ng/ml TNF $\alpha$  entsprechen in ihrer Variationsbreite den Ansprüchen der Untersuchung eines breiten Spektrums [SANO et al. 1994]. Die Ergebnisse von SASAKI et al. lassen zudem mit nachgewiesenen Stimulationseffekten bei 20 ng/ml TNF $\alpha$  über 24 h einen Stimulationseffekt auf SVE4-10-Zellen innerhalb des von SANO et al. untersuchten Konzentrationsbereiches erwarten [SANO et al. 1994; SASAKI et al. 2002]. Somit werden die Konzentrationen aus der Arbeit von SANO et al. für die vorliegende Arbeit übernommen [SANO et al. 1994]. Sie entsprechen den Aktivitäten von 1,4; 143 beziehungsweise 1430 U/ml des in dieser Arbeit verwendeten TNF $\alpha$ .

Als zweiter variabler Parameter der Stimulation ist die Inkubationszeit mit TNF $\alpha$  für die Untersuchungen wesentlich. Die Auswahl der zu beobachtenden Zeiten erfolgt ebenfalls auf der Basis der zur TNF $\alpha$ -Stimulation veröffentlichten Experimente an Oberflächenrezeptoren auf Primärkulturen. So wurde der Verlauf der TNF $\alpha$ -stimulierten Expression des ICAM-1-Rezeptors auf HUVE-Zellen über eine Stimulationszeit von bis zu 72 h beobachtet [SANO et al. 1994]. Damit umfasst dieses Experiment das weiteste Spektrum der Inkubationszeiten mit TNF $\alpha$  und schließt die Inkubationszeiten weiterer betrachteter Untersuchungen ein [VAN KAMPEN und MALLARD 2001; WAGNEROVA et al. 2002]. SANO et al. analysierten den Verlauf der Expression von ICAM-1 nach 3 bis 72 h und stellten einen bemerkenswerten Anstieg ihres betrachteten zellulären Antigens (ICAM-1) zwischen 3 und 6 h, eine Verminderung nach 48 h fest [SANO et al. 1994]. In Anlehnung an diese Ergebnisse und in Erwartung größerer Effekte während der ersten 24 h werden Inkubationszeiten von 4 bis 72 h für die Experimente der vorliegenden Arbeit festgelegt.

Im letzten Schritt der Zellmodellentwicklung steht die Detektion des Expressionsverhaltens der Rezeptoren zu den verschiedenen Kombinationen von Konzentration und Stimulationszeit im Mittelpunkt. Dazu werden die Markierungsmethode der indirekten Immunfluoreszenz sowie zwei unabhängige Detektionsverfahren gewählt. Der jeweilige Antikörper der ausgewählten Rezeptoren wird an die Zelle gekoppelt und mit einem weiteren, fluoreszenzmarkierten Antikörper markiert. Der Fluoreszenznachweis soll zunächst mit dem ELISA-Reader erfolgen. Diese Methode wird häufig zur Untersuchung von Oberflächenproteinen eingesetzt [CARLOS et al. 1990; STEWART et al. 1996; SCHOLZEN

et al. 2003]. Sie ermöglicht mit der Bearbeitung kleiner Volumina eine Vielzahl von parallelen Ansätzen. Aufgrund der Vielfalt von Konzentrationen und Inkubationszeiten bei jedem der drei Antikörper erweist sich diese Methode als sinnvoll. Die beobachteten Stimulationseffekte sollen im Anschluss mittels einer alternativen Nachweismethode verifiziert werden. Dazu soll die Analyse im Flow-Cytometer (FACS) erfolgen. Sie gestattet eine sehr genaue Messung der Fluoreszenzen jeder einzelnen Zelle. Aus diesem Grund wird sie in zahlreichen Arbeiten angewandt [YABKOWITZ et al. 1999; HIDESHIMA et al. 2001; SIMAK et al. 2002].

Für die Experimente zur Rezeptormarkierung werden – neben der Sterilitätskontrolle der untersuchten Zellen – im wesentlichen zwei Voruntersuchungen erforderlich sein. Zum einen sollen Einflüsse des Wachstumsstadiums der Zellkultur bei Beobachtung verschiedener Inkubationszeiten weitgehend ausgeschlossen werden. Deshalb wird ein für alle Inkubationszeiten gleichartiges Wachstumsstadium zum Zeitpunkt der Rezeptormarkierung angestrebt. Die Zellpopulation soll sich zu diesem Zeitpunkt noch vor der Phase des stationären Wachstums befinden, da fraglich ist, ob die in der Phase des stationären Wachstums vorliegenden Stressfaktoren [KLEINIG et al. 1999] die Expression unbeeinflusst lassen. Gleichzeitig wird ein konfluenter Zellteppich zum Zeitpunkt der Markierung forciert, um eine möglichst hohe Anzahl markierter Zellen und somit eine hohe Fluoreszenz zu erreichen. Um diese Bedingungen zu erfüllen, müssen vorerst die optimalen Aussaatzellzahlen ermittelt werden.

Zum anderen ist das Adhäsionsverhalten der Zellen während des Markierungsprozesses für die Untersuchungen im ELISA-Reader zu prüfen. Aufgrund der spezifischen Oberflächenproteinmuster jeder einzelnen Zelllinie sind Notwendigkeiten der Optimierung möglich. In diesem Falle sollen adhäsionsbeeinflussende Faktoren wie pH-Wert und Gehalt zweiwertiger Ionen des Puffers sowie die Wachstumsmatrix (Beschichtung) variiert werden.

Die Entwicklung eines Zellmodells durch Auswahl von Zelllinie, Oberflächenproteinen, Stimulans, Stimulanskonzentration und -inkubationszeit findet mit der Auswahl eines geeigneten Rezeptors und seinen optimalen Stimulationsparametern ihren Abschluss. Anschließend soll die Anwendung des Zellmodells anhand der Ankopplung einer Modellsonde exemplarisch gezeigt werden. Mit dem erfolgreich erprobten Zellmodell wird eine grundlegende Voraussetzung für die Entwicklung von In-vitro-Modellen geschaffen.

Zusammenfassend ergeben sich im einzelnen folgende Fragestellungen für die vorliegende Arbeit:

1. Parameter für optimales Rezeptorexpressionsverhalten im Verlauf der Rezeptormarkierung:
  - 1.1. Wird mit einer sterilen Zellkultur gearbeitet?
  - 1.2. Welche Aussaatzellzahlen sind für die unterschiedlichen Inkubationszeiten mit  $\text{TNF}\alpha$  optimal?
  - 1.3. Unter welchen Bedingungen ist eine optimale Adhäsion der SVE4-10-Zellen an die Adhäsionsmatrix (Polystyrol) während der Fluoreszenzmarkierung der Oberflächenrezeptoren zur Messung im ELISA-Reader möglich?
2. Wird die Expression eines der drei ausgewählten Oberflächenrezeptoren (CD106, CD105 und CD31) durch  $\text{TNF}\alpha$  stärker stimuliert als die Expression der anderen?
3. Welche Stimulationsparameter sind für die maximale Expression der drei gewählten Oberflächenrezeptoren auf SVE4-10-Zellen optimal? Existieren limitierende Faktoren?
4. Gibt es Unterschiede in der Detektion der Fluoreszenz zwischen den zwei unabhängigen Methoden?
5. Ist eine spezifische Ankopplung einer Modellsonde (magnetische Nanopartikel) an stimulierte Endothelzellen (Zellmodell) möglich?

### 3 Materialien

#### 3.1 Substanzen

<i><b>PRODUKT</b></i>	<i><b>HERSTELLER</b></i>
<b>Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG (H+L)</b>	Molecular Probes, Eugene, Oregon USA
<b>Anti-CD105/Endoglin rat anti-mouse (Clone MJ7/18)</b>	Southern Biotechnologies Associates, Inc., Birmingham, AL USA
<b>Anti-CD106/VCAM-1 rat anti mouse (CloneM/K-2)</b>	Southern Biotechnologies Associates, Inc., Birmingham, AL USA
<b>Anti-CD106/VCAM-1 rat anti mouse, biotinyliert (CloneM/K-2)</b>	Southern Biotechnologies Associates, Inc., Birmingham, AL USA
<b>Anti-CD31/PECAM-1 rat anti-mouse biotinyliert (Clone 390)</b>	Southern Biotechnologies Associates, Inc., Birmingham, AL USA
<b>BCA-Protein-Assay</b>	Pierce, Rockfort, IL USA
<b>Bleicitrat</b>	Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
<b>Bovine serum albumin (BSA)</b>	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
<b>Bovine serum albumin (BSA), biotinfrei</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<b>Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat</b>	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
<b>Calciumchlorid (CaCl)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<b>Cell Titer96AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS-Test)</b>	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
<b>DAPI (4',6-Diamidino-2-phenyl-indolx2HCl p.A.)</b>	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
<b>Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (25 mM Glucose, 1,0 mM Natriumpyruvat)</b>	GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisely, Schotland
<b>Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium ohne Phenolrot und L-Glutamin (1,8 mM D-Glucose, 1,0 mM Natriumpyruvat)</b>	GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisely, Schotland
<b>Durcupan ACM</b>	Fluka/ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tautkirchen, Deutschland

<b>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<b>Fetales Kälberserum (FKS)</b>	GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisely, Schotland
<b>Gelatine</b>	Sigma Chemikal CO, St. Louis, MO USA
<b>Glutaraldehyd 25% E.M. Grade</b>	Agar Scientific LTD, Essex, UK
<b>Isopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH)</b>	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
<b>Isotyp-Kontrolle rat IgG<sub>1κ</sub> (Clone KLH/G1-2-2)</b>	Southern Biotechnologies Associates, Inc., Birmingham, AL USA
<b>Kaliumhydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<b>Magnesiumsulfat, hydratisiert (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<b>Methanol (CH<sub>3</sub>OH)</b>	Sigma Chemical CO., St. Louis; MO USA
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<b>Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<b>Osmium</b>	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
<b>Phosphat buffered saline (PBS) 0,1 M, pH 7,2</b>	GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisely, Schotland
<b>Poly-L-Lysin-Solution 0,01%, cell culture</b>	Sigma Diagnostics INC., St. Louis, MO USA
<b>Recombinant murine TNF-α exprimiert in E. coli, Biol. Aktivität 20-50x10<sup>6</sup> U/mg (gemessen in der Mauszelllinie L-929)</b>	R&D Systems Inc., Mineapolis, MN USA
<b>Sodiumdodecylsulfat (SDS)</b>	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
<b>Streptavidin Micro Beads</b>	Miltenyi Biotec, Auburn, CA USA
<b>SVEC4-10-Zelllinie</b>	American Type Culture Collection, Manassas, USA
<b>Trypanblau</b>	Riedel-de Haen AG, Seelze, Deutschland
<b>Trypsin/ EDTA 0,25% bzw. 0,02% in PBS</b>	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
<b>Uranylacetat</b>	Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
<b>Ziegen-Serum</b>	Sigma Diagnostics INC., St. Louis, MO USA



### 3.2 Verbrauchsmaterialien

<i><b>PRODUKT</b></i>	<i><b>HERSTELLER</b></i>
<b>96-well Mikrotiterplatten für Zellkultur (Polysterolboden)</b>	Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark
<b>96-well Mikrotiterplatten für Zellkultur Fluoreszenz (Polysterolboden)</b>	BD Biosciences, Bedford, MA USA
<b>Alufolie</b>	Papstar Vertriebsgesellschaft mbH & Co. KG, Kall, Deutschland
<b>Chamber-Slide</b>	Nalge Nunc International, Naperville, USA
<b>Deckgläser</b>	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
<b>Einfrierröhrchen</b>	Simport Plastics, Quebec, Kanada
<b>Eppendorf-Cups</b>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
<b>FACS-Röhrchen</b>	BD Biosciences, Bedford, MA USA
<b>Falcon-Tubes</b>	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
<b>Glasmaterial</b>	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>MS-Säule</b>	Miltenyi Biotec, Auburn, CA USA
<b>Pipettenspitzen</b>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
<b>Thomakammer</b>	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Zellkulturflasche</b>	Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark

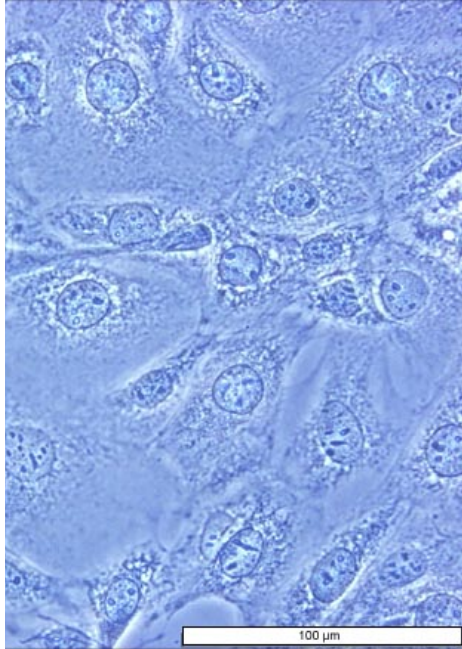
### 3.3 Geräte

<i><b>PRODUKT</b></i>	<i><b>HERSTELLER</b></i>
<b>Absorptionsspektrometer für Elisaplatten SLT</b>	Labinstruments Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
<b>Akku-Boy Pipettus-Akku</b>	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
<b>Auswertungsprogramm</b>	Microsoft Excel 97
<b>Auswertungsprogramm</b>	SigmaPlot 8.0
<b>Auswertungsprogramm</b>	SPSS
<b>Autoklav für Flüssigkeiten, Varioklav</b>	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleissheim, Deutschland
<b>Autoklav für Materialien, HVP-50</b>	Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
<b>Brenner Vulcan</b>	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
<b>Brutschrank</b>	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
<b>Brutschrank (unsteril)</b>	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
<b>Digitalkamera</b>	Olympus optical, Co. LTD., USA
<b>Einfriergefäß</b>	Qualilab, Bender & Hobein, USA
<b>Eismaschine Ziegra</b>	Dresdner Kühlanlagenbau, Dresden, Deutschland
<b>Elisa-Reader Wallace 1420 Victor</b>	PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA USA
<b>Eppendorfpipetten (20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 2500 µl)</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Feinwaage isocal AC 211P</b>	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
<b>Flow-Cytometer FACS-Calibur</b>	BD Biosciences, Bedford, MA USA
<b>Fotobearbeitungsprogramm</b>	Adobe Photoshop 7.0
<b>Kurzzeitwecker</b>	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
<b>MACS – Magnet</b>	Miltenyi Biotec, Auburn, CA USA
<b>Magnetrührer</b>	IKA Labortechnik GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland

<b>Mikroskop BX-50</b>	Olympus, Hamburg, Deutschland
<b>Phasenkontrastmikroskop Olympus CK 40</b>	Olympus, Hamburg, Deutschland
<b>pH-Meter</b>	Hanna instruments, Portugal
<b>Reinraumwerkbank</b>	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
<b>Reservoir</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Rüttler Unimax 2010</b>	Heidolph Instruments & Co. KG, Schwabach, Deutschland
<b>Stickstofftonne Chronos</b>	Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland
<b>Tiefkühltruhe (-18°C)</b>	Liebherr-Holding GmbH, Biberach an der Riss, Deutschland
<b>Tiefkühltruhe (-80°C)</b>	Scientific Equipment Group GmbH, Egelsbach, Deutschland
<b>Transferpipette 8</b>	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
<b>Trockenschrank</b>	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
<b>Vortex</b>	Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y. USA
<b>Wasserbad</b>	GFL Gesellschaft für Laborgerätektechnik, Burgwedel, Deutschland
<b>Zentrifuge Biofuge primo</b>	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
<b>Zentrifuge 5415 D</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

## 4 Methoden

### 4.1 Charakterisierung der Zelllinie SVEC4-10



**Abbildung 1: Kultur der Zelllinie SVEC4-10 in 500facher Vergrößerung im Phasenkontrast. Messbalken 100 µm.**

Die folgenden Untersuchungen wurden an der Zelllinie SVEC4-10 durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine permanente Zelllinie. Die Endothelzellen wurden aus Lymphgefäßen eines axillären Lymphknotens einer männlichen Maus isoliert. Anschließend erfolgte eine Transformation mit dem SV40-Virus. Die Zelllinie exprimiert MHC I, VCAM, H-2K, das Faktor VIII-ähnliche-Antigen sowie Rezeptoren mit hoher Affinität zu LDL [AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC) 2002].

Die Verdopplungsrate der Zellen liegt zwischen 24 und 30 h. Die Zellen verhalten sich gegenüber Interleukinen und Signalen der extrazellulären Matrix wie normale Endothelzellen. Sie sind in der Lage, in vivo einen Spindelzelltumor zu induzieren,

dessen Charakteristik ähnlich der des humanen Karposisarkoms ist [O'CONNELL et al. 1991; AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC) 2002]. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Passagezahlen zwischen 8 und 40 gearbeitet.

### 4.2 Zellkultur

#### 4.2.1 Auftauen und Kultivieren von Zellen

Lösungen: **Kulturmedium**

DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem  
FKS (60 min bei 56°C im Wasserbad)

Die SVE4-10-Zellen wurden in Kulturflaschen mit einer Grundfläche von 25, 75 und 160 cm<sup>2</sup> bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (Standardkulturbedingungen) kultiviert. Das Arbeiten mit der Zellkultur erfolgte grundsätzlich unter sterilen Bedingungen an der Reinraumwerkbank.

Zunächst wurde eine 160-cm<sup>2</sup>-Kulturflasche mit 30 ml Kulturmedium bestückt und für 10 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde ein Röhrchen mit  $1 \times 10^7$  Zellen aus dem Stickstoffbehälter entnommen und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde sofort in die vorbereitete Kulturflasche gegeben. Aufgrund der Toxizität des im Einfriermedium enthaltenen DMSO wurde am folgenden Tag ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei das alte Medium abpipettiert und durch 30 ml frisches, raumtemperiertes Medium ersetzt wurde.

#### 4.2.2 Passagieren von Zellen

Lösungen:	<b>Kulturmedium</b>	siehe 4.2.1
	<b>PBS</b>	0,1 M, pH 7,2
	<b>Trypsin/ EDTA-Lösung</b>	0,25% beziehungsweise 0,02% in PBS

Bei 80-90%iger Konfluenz der Zellpopulation wurde diese nach mikroskopischer Kontrolle und Verwerfen des verbrauchten Mediums dreimal mit raumtemperiertem PBS gewaschen. Damit wurde der trypsinhemmende Einfluss des Kulturmediums minimiert. Anschließend wurde zur Zellablösung eine Trypsin/ EDTA-Lösung auf den Zellrasen gegeben. Es erfolgte eine 3minütige Inkubation unter Standardkulturbedingungen im Brutschrank. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde die Trypsinwirkung durch Mediumzugabe gestoppt. Die gut durchmischte Zellsuspension wurde in einen Falkontube transferiert und auf Eis gelagert. Zuvor wurden 100 µl für die Zellzahlbestimmung abgenommen. Nach Berechnung der Zellzahl wurden  $2,1 \times 10^6$  Zellen auf eine mit 15 ml Kulturmedium vorbereitete, mittlere Kulturflasche ausgesät. Bei einer Kultivierung in 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen alle 3-4 Tage passagiert. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

Das Zellwachstum und die Zellmorphologie wurden täglich unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert.

### 4.2.3 Zellzahlbestimmung

Lösungen:	<b>Kulturmedium</b>	siehe 4.2.1
	<b>PBS</b>	siehe 4.2.2
	<b>Trypsin/ EDTA-Lösung</b>	siehe 4.2.2
	<b>Trypanblau-Stammlösung</b>	400 mg Trypanblau in 100 ml 0,1 M PBS (filtriert)

Für die Zellzahlbestimmung wurden 100 µl der Zellsuspension mit 900 µl der Trypanblau-Stammlösung in einem 1,5 ml-Eppendorf-Cup verdünnt. Ein Teil dieser Lösung wurde in zwei Thomakammern pipettiert. Die Zellzahlen der beiden Kammern wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Mit der folgenden Formel wurde die Gesamtzellzahl in dem vorhandenen Suspensionsvolumen errechnet.

$$\frac{\bar{x} * V_S * a}{V_T} = \frac{\bar{x} * 1000 \mu l * 10}{0,064 \mu l} = \text{Zellzahl}$$

$\bar{x}$	Quersumme der beiden ermittelten Zellzahlen
$V_S$	Volumen der Messsuspension (1000µl) (900 µl Trypanblaulösung + 100 µl Zellsuspension)
a	Verdünnungsfaktor
$V_T$	Volumen der Thomakammer über dem Zählraster

### 4.2.4 Einfrieren von Zellen

Lösungen:	<b>Kulturmedium</b>	siehe 4.2.1
	<b>PBS</b>	siehe 4.2.2
	<b>Trypsin/ EDTA-Lösung</b>	siehe 4.2.2
	<b>Einfrieremedium</b>	Kulturmedium mit 8% DMSO

Um einen Zellpool anzulegen, wurden die Zellen vermehrt und anschließend eingefroren. Das Ablösen der Zellen erfolgte wie im 4.2.2 beschrieben. Nach der Zellzahlbestimmung wurde die Suspension 5 min bei 200xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Durch Zugabe von gekühltem Einfriermedium wurde die Zellkonzentration auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die entstandene Zellsuspension wurde auf 1 ml-Einfriertubes verteilt, in einem isopropanolhaltigem Kühlgefäß 15 min auf Eis, dann zwei Tage bei  $-80^\circ\text{C}$  und schließlich in flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$  gelagert.

### 4.3 Voruntersuchungen zur Rezeptormarkierung

#### 4.3.1 Mykoplasmentest

Lösungen:	<b>Kulturmedium</b>	siehe 4.2.1
	<b>PBS</b>	siehe 4.2.2
	<b>Trypsin/ EDTA-Lösung</b>	siehe 4.2.2
	<b>DAPI-Stammlösung</b>	5 µg DAPI in 1 ml Aqua dest. Konz. 14,3 µmol/l
	<b>DAPI-Gebrauchslösung</b>	0,2 ml Stammlösung in 10 ml Methanol Konz. 0,28 µmol/l

Um eine Mykoplasmenkontamination in den Zellkulturen auszuschließen, wurde ein DAPI-Test durchgeführt. Hierbei ermöglicht das spezifisch an Adenin-Thymin-Brücken der DNA bindende Fluorochrom DAPI eine selektive DNA-Darstellung [SCHWEIZER 1976]. Bei Mykoplasmenkontamination werden diffuse Fluoreszenzintensitäten im Zytoplasma der Zellen sichtbar. Diese werden durch Anfärbung der Mykoplasmen-DNA verursacht [LINDL 2000]. Die Mitochondrien-DNA färbt sich dabei nur geringfügig an und verursacht somit keine große Hintergrundfluoreszenz [LINDL 2000].

Die Zellen wurden – wie im Abschnitt 4.2.2 und 4.2.2 beschrieben – abgelöst. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt. In 800 µl Kulturmedium wurden  $0,3 \times 10^6$  Zellen auf ein Chamber-Slide mit einer Wachstumsfläche von  $1,8 \text{ cm}^2$  ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte über 24 h bei Standardkulturbedingungen. Nach Abpipettieren des Mediums wurde die Kammer dreimal mit raumtemperierten PBS und einmal mit DAPI-Gebrauchslösung gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 400 µl DAPI-Gebrauchslösung zu jeder

Kammer. Diese wirkte 15 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> ein. Nach beendeter Inkubation wurde die Farbstofflösung abpipetiert und die Kammer viermal mit PBS gespült. Die Slidebegrenzung wurde entfernt und die Zellen wurden mit PBS unter einem Deckglas eingedeckt. Im Anschluss wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (500fache Vergrößerung) betrachtet, wobei die Filtereinstellung WU (330-385 nm) verwendet wurde.

#### **4.3.2 Ermittlung der optimalen Aussaatzellzahlen für verschiedene Wachstumszeiten**

Es ist bekannt, dass das Zellwachstum von Kulturen verschiedene Phasen durchläuft. Dabei geht die Phase des nahezu linearen Wachstums bei Erschöpfung der Nährstoffe und Anreicherung ungünstig beeinflussender Stoffwechselprodukte sowie zu hoher Zelldichte in eine stationäre Phase über (logistische Wachstumskurve) [BECKER et al. 1994]. Hier wird die Zellteilung vermindert oder die Zellzahl durch ähnliche Raten der Zellteilung und des Zellsterbens weitgehend konstant gehalten [KLEINIG et al. 1999].

Die Rezeptormarkierung der Zellen erfolgte nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. Um zu Beginn der Rezeptormarkierung stets eine konfluente Zellkultur vor der stationären Wachstumsphase bearbeiten zu können, wurde das Wachstumsverhalten der SVE4-10-Zellen untersucht.

Lösungen:	<b>Kulturmedium</b>	siehe 4.2.1
	<b>PBS</b>	siehe 4.2.2
	<b>Trypsin/ EDTA-Lösung</b>	siehe 4.2.2
	<b>MTS-Test</b>	Cell Titer96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Zur Aussaat optimaler Zellzahlen für verschiedene Wachstumszeiten der Zellen in den Wells einer 96-well-Mikrotiterplatte wurden vier Wachstumskurven ermittelt. Der dazu notwendige Vitalitätsnachweis der Zellen erfolgt durch den MTS-Test [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]. Bei diesem Test wird ein Tetrazoliumsalz – als Cell Titer96AQueous One Solution gelöst – zu den Zellen gegeben. Hierbei handelt es sich um ein Reagenz, welches durch die Dehydrogenasen vitaler Zellen zu blaugefärbtem Formazan umgesetzt wird. Die Blaufärbung verhält sich dabei proportional zur Anzahl der lebenden Zellen in der Kultur. Sie ist bei einer Wellenlänge von 492 nm



photometrisch messbar [PROMEGA 2003]. Somit ist es möglich, vitale Zellen selektiv darzustellen.

Für die Aussaat der SVE4-10-Zellen wurde die in der gewonnenen Zellsuspension (siehe 4.2.2. und 4.2.2) noch vorhandene Trypsin/ EDTA-Lösung entfernt. Dies erfolgte, indem die Zellen 5 min bei 200xg zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Zellkonzentration mit neuem Kulturmedium eingestellt. Es wurden  $0,25 \times 10^4$ ,  $0,5 \times 10^4$ ,  $0,75 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1,25 \times 10^4$ ,  $1,5 \times 10^4$ ,  $1,75 \times 10^4$  und  $2 \times 10^4$  Zellen pro Well ( $0,33 \text{ cm}^2$ ; Arbeitsvolumen 100  $\mu\text{l}$ ) ausgesät. Für die Untersuchung der Inkubationszeit von 107 h wurden geringere Zellzahlen ausgesät. Hier erfolgte die Untersuchung von  $0,5 \times 10^3$ ,  $0,75 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1,25 \times 10^3$ ,  $1,5 \times 10^3$  und  $2 \times 10^3$  Zellen pro Well. Eine Kontrolle mit reinem Medium wurde ebenso wie alle anderen Ansätze stets vierfach mitgeführt. Die Inkubation aller Zellen erfolgte unter Standardkulturbedingungen. Nach 21, 45, 69 beziehungsweise 107 h wurden jeweils die entsprechenden Zellkonzentrationen anhand des MTS-Tests untersucht.

Für diesen Vitalitätsnachweis wurden zu jedem Well 20  $\mu\text{l}$  Cell Titer96Aqueous One Solution hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen 45 min bei Standardkulturbedingungen im Brutschrank inkubiert. Die Messung im Absorptionsphotometer erfolgte nach 10 s leichtem Schütteln bei einer Wellenlänge von 492 nm.

Zur Ermittlung der Aussaatzellzahlen wurden die Absorptionsmittelwerte der jeweils dreifach mitgeführten Ansätze errechnet. Die Untersuchung und Darstellung der Abhängigkeit der Absorptionsmittelwerte (Lebendzellzahl) von der Aussaatzellzahl erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 8.0. Entsprechend den logistischen Kurvenverläufen wurden die Aussaatzellzahlen für die vier verschiedenen Wachstumszeiten festgelegt.

#### ***4.3.3 Optimierung der Zelladhäsion für die Untersuchungen am ELISA-Reader durch Variation von Waschpuffer und Wachstumsmatrix***

Zur Optimierung der Zellhaftung und somit der Signalintensität wurde die Zelladhäsion auf verschiedenen Beschichtungen in Kombination mit unterschiedlichen Waschpuffern untersucht. Durch die Variationen sollten Einflussfaktoren wie die Wachstumsmatrix, der pH-Wert des Puffers sowie der Zusatz zweiwertiger Ionen im Puffer untersucht werden.

Lösungen:	<b>Beschichtung</b>	1% Gelatine in Aqua dest., steril
		0,01% ige Poly-L-Lysin-Lösung in Aqua dest., steril
	<b>PBS</b>	siehe 4.2.2
	<b>Kulturmedium</b>	siehe 4.2.1
	<b>Blockpuffer</b>	10% BSA im jeweiligen Waschpuffer
	<b>Waschpuffer</b>	DMEM ohne Phenolrot pH 7,2
		Phosphatpuffer pH 7,2 und 7,4 (PB)
		PBS pH 7,2 und 7,4 (PBS)
		PBS mit zweiwertigen Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ )
		pH 7,2 und 7,4 (PBS+M)

### Waschpuffer

Es wurden die Puffer Phosphatpuffer (PB), phosphat buffered saline (PBS) und phosphat buffered saline mit Zusatz der zweiwertigen Ionen  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS+M) untersucht. Sie lagen alle in einer Molarität von 0,1 M vor und wurden jeweils auf die pH-Werte 7,2 und 7,4 titriert (Tabelle 1).

Ein Teil des jeweiligen Waschpuffers wurde mit 10% BSA versetzt, um die Bedingungen im für die Antikörperverdünnungen benötigten Blockpuffer zu simulieren.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der verschiedenen Waschpuffer zur Untersuchung der optimalen Zelladhäsion von SVEC4-10-Zellen auf verschiedenen Wachstumsmatrizes einer 96-well-Mikrotiterplatte während der Wasch- und Markierungsschritte. Die Puffer wurden jeweils auf die pH-Werte pH 7,2 und 7,4 eingestellt.**

	Saure Komponente (in Aqua dest.)	Basische Komponente (in Aqua dest.)
<b>Phosphatpuffer (PB)</b>	1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
<b>PBS</b>	1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 137 mM NaCl	1,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 137 mM NaCl
<b>PBS mit zweiwertigen Ionen (PBS+M)</b>	1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 137 mM NaCl 1,8 mM CaCl 4 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 137 mM NaCl 1,8 mM CaCl 4 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

### Beschichtung der Polysterolmatrix

Die Beschichtung erfolgte mit den Substanzen Gelatine und Poly-L-Lysin. Es wurde eine 1%ige Gelatinelösung in Aqua dest. hergestellt und autoklaviert. Für die Poly-L-Lysin-Beschichtung wurde die 0,01% Poly-L-Lysin-Lösung für Zellkulturen verwendet.

Die beiden Substanzen wurden jeweils in den zwei nachfolgend beschriebenen Beschichtungsverfahren untersucht.

- a) Die Wells einer 96-well-Mikrotiterplatte wurden im ersten Verfahren mit 33 µl Poly-L-Lysin beziehungsweise Gelatinelösung bestückt und 10 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die bedeckte Platte 60 min bei 60°C im Trockenschrank inkubiert.
- b) Im zweiten Beschichtungsverfahren wurden die Wells mit je 33 µl Poly-L-Lysin beziehungsweise Gelatinelösung befüllt und 30 min im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen.

Bei beiden Beschichtungsverfahren wurden die Platten anschließend sechsmal mit 100 µl PBS pro Well gewaschen.

### Aussaat und Waschvorgang des Zellrasens

Es wurden  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well in allen beschichteten und unbeschichteten Wells ausgesät. Als Kontrollen dienten entsprechende zellfreie Ansätze. In diese Leerwertansätze wurde reines Kulturmedium gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen beziehungsweise der zellfreien Ansätze über 15 h bei Standardkulturbedingungen im Brutschrank.

Nach definierten Inkubationszeiten wurde das alte Medium abpipettiert. Es wurden 100 µl des jeweiligen Waschpuffers in die Wells gegeben. Jeder Waschpuffer wurde mit jeder Beschichtung kombiniert, wobei alle Ansätze dreifach mitgeführt wurden. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen analog zum Ablauf der geplanten Rezeptoruntersuchungen der Hauptexperimente. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Waschpuffer abpipettiert und je 50 µl des jeweiligen Blockpuffers – entsprechend der primären Antikörperzugabe – in die Wells gegeben. Es erfolgte eine einstündige Inkubation auf Eis. Daran schlossen sich drei Waschgänge mit je 100 µl des entsprechenden Waschpuffers und jeweils 10minütiger Inkubation der Zellen auf Eis an. Nach Abpipettieren des Überstands des letzten Waschganges wurden erneut 50 µl Blockpuffer in die Wells gegeben. Die Zellen wurden eine Stunde auf Eis inkubiert. Dieser Schritt simulierte die

Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Absatz 4.4.1.1). Danach folgten drei Waschgänge der Zellen beziehungsweise zellfreien Kontrollen mit 100 µl des entsprechenden Waschpuffers und einer immer daran anschließenden Inkubation auf Eis von 10 min.

Vor und nach jedem Waschgang erfolgte bis zur Cell Titer96AQueous One Solution-Zugabe eine optische Kontrolle der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop. Als Kriterien der verminderten Adhäsion wurden folgende morphologische Veränderungen zu Grunde gelegt:

- Verfeinerung der Zellfortsätze
- Abrundung der Zellen
- Konfluenzminderung des Zellteppichs

Zur Lebendzellzahlbestimmung nach dem letzten Waschgang wurden erneut 100 µl des entsprechenden Waschpuffers in die Wells pipettiert. Nach Zugabe von je 20 µl Cell Titer96AQueous One Solution pro Well [PROMEGA 2003] erfolgte eine 45minütige Inkubation der Proben bei 37°C. Der weitere Verlauf der Vitalitätsmessung erfolgte wie im Absatz 4.3.2 beschrieben.

Zur statistischen Auswertung der Lebendzellzahlbestimmung wurden die Absorptionsmittelwerte der zellfreien Ansätze von den Absorptionsmittelwerten der entsprechenden zellhaltigen Ansätze subtrahiert. Somit wurden die Messwerte um die medium- und beschichtungsbedingten Absorptionen vermindert. Die resultierenden Werte wurden in einer statistischen Multivarianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Post Hoc Test im Programm SPSS ausgewertet. Dabei ist p die Wahrscheinlichkeit, dass dieser oder ein größerer f-Wert in einer Stichprobe gefunden wird, wenn in der Population die Nullhypothese gilt.  $\alpha$  entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit.

Die Ergebnisse wurden mit dem Programm Microsoft Excel 97 dargestellt.

#### 4.4 Untersuchungen zur Expression der Oberflächenrezeptoren CD106, CD105 und CD31 auf TNF $\alpha$ -stimulierten SVE4-10-Zellen

Um Informationen über die Veränderung der Oberflächenrezeptorexpression auf SVE4-10-Zellen unter Stimulation mit TNF $\alpha$  zu erhalten, wurden drei verschiedene Stimulationskonzentrationen an TNF $\alpha$  sowie fünf verschiedene Inkubationszeiten festgelegt. Sowohl stimulierte als auch unstimulierte Zellen wurden zu jeder Konzentration-Zeit-Kombination mit dem primären Antikörper gegen einen der drei Oberflächenrezeptoren inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Markierung des primären Antikörpers mit einem sekundären Antikörper, an welchen der Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 gekoppelt war (Abbildung 2). Die Fluoreszenzintensitäten wurden im ELISA-Reader beziehungsweise Flow-Cytometer (FACS) gemessen sowie fluoreszenzmikroskopisch dargestellt.

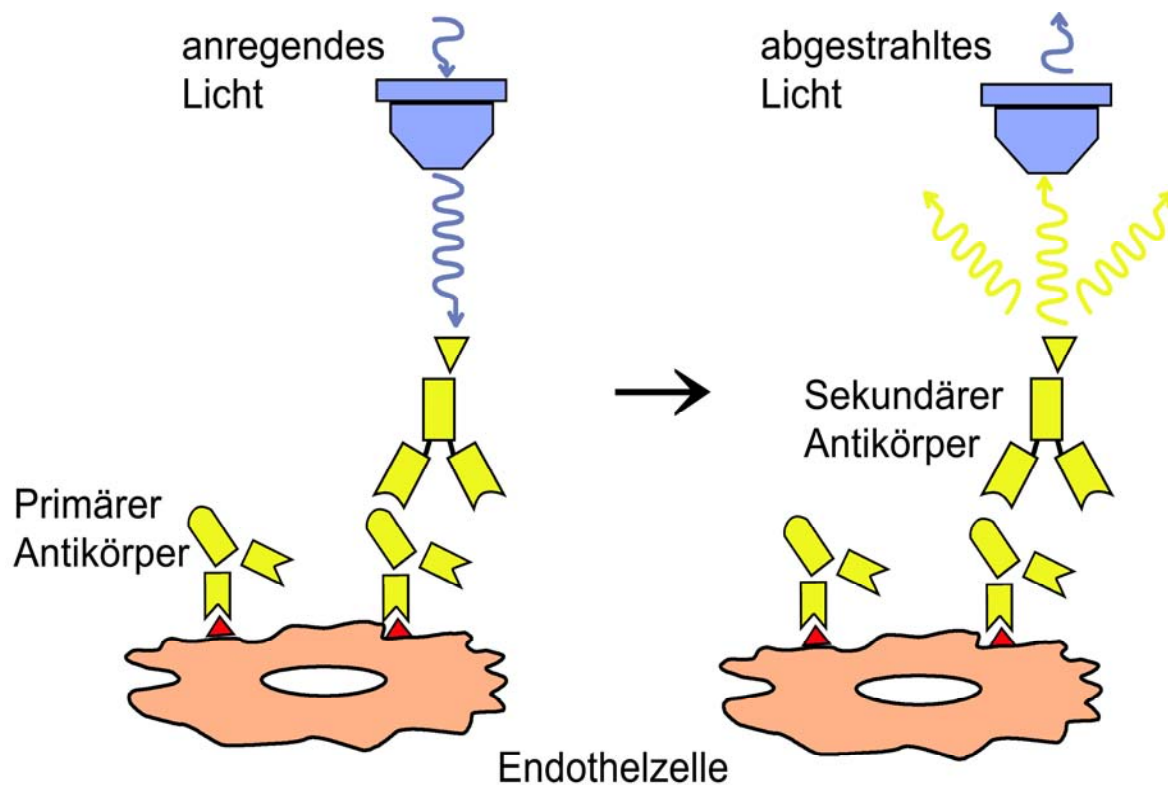


Abbildung 2: Allen immunfluorometrischen Messungen und Darstellungen von Rezeptoren in der vorliegenden Arbeit wurde das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz zu Grunde gelegt. Nach Bindung des primären Antikörpers an den Oberflächenrezeptor wird der primäre Antikörper durch einen sekundären Antikörper mit gebundenem Fluoreszenzfarbstoff (gelbes Dreieck) markiert. Somit ist nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes eine fluorometrische Detektion des Oberflächenrezeptors möglich [nach JANEWAY et al. 2002].

#### 4.4.1 Untersuchungen am ELISA-Reader zur Expression von CD106, CD105 und CD31 auf SVE4-10-Zellen nach Simulation mit $TNF\alpha$

Die SVE4-10-Zellen wurden mit 0,05; 5 beziehungsweise 50 ng/ml  $TNF\alpha$  über jeweils 4, 12, 24, 48 beziehungsweise 72 h inkubiert. Es folgte die Untersuchung der Rezeptorexpression von CD106, CD105 und CD31 anhand der in Abbildung 2 dargestellten Markierungsmethode. Die Fluoreszenzintensitäten wurden im ELISA-Reader gemessen. Als Bezugsgröße zur jeweiligen Fluoreszenzintensität wurde anschließend die Proteinmenge pro Well anhand eines Proteinassays bestimmt.

##### 4.4.1.1 Fluorometrische Messungen zum semiquantitativen Rezeptornachweis

Lösungen:	<b>Beschichtung</b>	1% Gelatine in Aqua dest., steril
	<b>PBS</b>	siehe 4.2.2
	<b>Kulturmedium</b>	siehe 4.2.1
	<b>Trypanblau-Stammlösung</b>	siehe 4.2.2
	<b>Waschpuffer</b>	DMEM ohne Phenolrot
	<b>Blockpuffer</b>	10% Ziegen-Serum im Waschpuffer
	<b>Antikörper</b>	<u>Primäre Antikörper</u> ( <b>CD106, CD105, CD31, Isotyp IgG<sub>1</sub></b> ) 1:100 im Blockpuffer verdünnt
		<u>Sekundärer Antikörper</u> ( <b>Alexa488 anti rat</b> ) 1:200 im Blockpuffer verdünnt
	<b><math>TNF\alpha</math>-Vorverdünnungen</b>	1000 ng/ml in PBS (0,1 M, pH 7,2) 100 ng/ml in PBS (0,1M, pH 7,2) 1 ng/ml in PBS (0,1M, pH 7,2)
	<b>SDS-Stammlösung</b>	10% SDS in PBS (0,1 M, pH 7,2)
	<b>SDS-Gebrauchslösung</b>	1% SDS-Stammlösung in DMEM Konz. 0,1% SDS in DMEM

Die Wells der 96-Well-Fluoreszenz-Mikrotiterplatte wurden mit 1%iger Gelatine beschichtet. Nach 10minütiger Inkubation im Brutschrank wurde der Überstand abpipettiert und die Platte

60 min im Trockenschrank inkubiert (Absatz 4.3.3.). Nach Beschichtung der Wells wurden diese mit Zellen bestückt. Aufgrund der unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die in Tabelle 2 angegebenen Zellzahlen ausgesät (siehe 4.3.2).

**Tabelle 2: Aussaatzellzahlen der SVE4-10-Zellen in den Wells der 96-Well-Mikrotiterplatten (Wachstumsfläche 0,33cm<sup>2</sup>) zur anschließenden optimalen Rezeptormarkierung. Nach einer Wachstumszeit von 24 h und zusätzlichen Inkubationszeiten mit TNF $\alpha$  von 4, 12, 24, 48 bzw. 72 h erfolgte die Markierung der Oberflächenrezeptoren CD106, CD105 bzw. CD31.**

Inkubationszeit mit TNF $\alpha$ (h)	4	12	24	48	72
Ausgesäte Zellzahl/ Well	14000	12000	8000	5000	1000

Als Kontrollen wurden folgende Ansätze vierfach mitgeführt:

- K1** primärer Antikörper des gleichen Isotyps (IgG<sub>1</sub>) auf stimulierten SVE4-10-Zellen mit sekundärem Antikörper Alexa488
- K2** zellfreier Ansatz

Das Anwachsen der Zellen über 24 h erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Anschließend wurde das Medium abpipettiert und ein Teil der zellhaltigen Wells mit 0,05; 5 oder 50 ng/ml TNF $\alpha$  in DMEM bestückt. Die so erreichten Aktivitäten von TNF $\alpha$  pro Well lagen bei 1,4; 143 beziehungsweise 1430 U/ml (Arbeitsvolumen 100  $\mu$ l). Durch Vorverdünnungen des TNF $\alpha$  wurde sichergestellt, dass immer das gleiche Volumenverhältnis von Stimulans und Kulturmedium vorlag.

Um eine Referenz zum Verhalten der stimulierten Zellen zu ermitteln, wurde ein Teil der zellhaltigen Wells mit stimulansfreiem, reinem Kulturmedium bestückt. Die Inkubation der stimulierten Zellen und der dazugehörigen unstimulierten Kontrollen erfolgte über 4, 12, 24, 48 beziehungsweise 72 h. Danach wurden die Zellen im Phasenkontrast mikroskopisch kontrolliert. Im nun folgenden Prozess der Rezeptormarkierung wurde phenolrotfreies DMEM als Waschpuffer (WP) verwendet. Für den Blockpuffer (BP) wurde Waschpuffer mit 10% Ziegen-Serum versetzt. Jeder Oberflächenrezeptor wurde in sechsfachem Ansatz auf stimulierten Zellen und ebenso in sechsfachem Ansatz auf unstimulierten Zellen markiert. Die anschließende Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte in einer 0,1%igen SDS/ DMEM-Lösung. Die Arbeitsschritte zur Markierung der Rezeptoren sind im Folgenden detailliert beschrieben (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Arbeitsschritte zur Rezeptormarkierung (CD106, CD105 bzw. CD31) auf SVE4-10-Zellen nach Stimulation mit TNF $\alpha$  (0,05; 5 bzw. 50 ng/ml über 4, 12, 24, 48 bzw. 72 h) bzw. auf unstimulierten SVE4-10-Zellen zur anschließenden fluorophotometrischen Rezeptordetektion im ELISA-Reader. WP - Waschpuffer, BP - Blockpuffer, K2 - Kontrolle 2.**

Inkubationszeit	Arbeitsschritt
	Abpipettieren des Überstands der Zellen und Zugabe von 100 $\mu$ l/Well WP
10 min	Inkubation der Zellen auf Eis
	Abpipettieren des WP und Zugabe von 50 $\mu$ l/Well des entsprechenden primären Antikörpers im BP beziehungsweise des reinen BP (K2)
60 min	Inkubation der Zellen auf Eis
	Dreimaliges Waschen der Zellen mit 100 $\mu$ l/Well WP, zwischenzeitlich immer 10minütige Inkubation auf Eis
	Alle folgenden Schritte wurden in Dunkelheit durchgeführt
	Abpipettieren des WP und Zugabe von 50 $\mu$ l/Well des sekundären Antikörpers im BP beziehungsweise des reinen BP (K2)
60 min	Inkubation der Zellen auf Eis
	Dreimaliges Waschen der Zellen mit WP, zwischenzeitlich immer 10minütige Inkubation auf Eis
	Vollständiges Abpipettieren des Überstands und Zugabe von 25 $\mu$ l SDS-Gebrauchslösung /Well
10 min	Inkubation der Platte auf dem Rüttler bei 65 rpm/min

Im Anschluss erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensitäten der markierten Rezeptoren im ELISA-Reader. Dazu wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Parameter zur fluorometrischen Detektion im ELISA-Reader eingestellt.

**Tabelle 4: Parametereinstellung des ELISA-Readers zur fluorometrischen Detektion der Alexa488-markierten Rezeptoren CD106, CD105 bzw. CD31 auf TNF $\alpha$ -stimulierten und unstimulierten SVE4-10-Zellen.**

Absorption	Emission	Messzeit/ Well	Detektion
485 nm	520 ( $\pm$ 10) nm	1 s	Über Spiegelblock und Filter im Detektor oberhalb der Probe



Während des gesamten Waschvorganges bis zur Zugabe des lichtempfindlichen sekundären Antikörpers erfolgte nach jedem Waschschrift eine Kontrolle der Zellen im Phasenkontrastmikroskop zur Beurteilung der Zellkonfluenz und Morphologie.

Alle Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt. Die statistische Auswertung der Fluoreszenzrohdaten erfolgte für den jeweiligen Rezeptor zu jeder einzelnen Konzentrations-Zeit-Kombination anhand einen zweiseitigen t-Tests im SPSS-Programm. Dabei wurden jeweils die stimulierten gegen die unstimulierten Zellen getestet.

Die Spezifität der Antikörperbindungen auf stimulierten Zellen wurde anhand eines Antikörpers des gleichen Isotyps auf stimulierten Zellen überprüft. Dazu wurden die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten der spezifischen und unspezifischen Markierungen auf stimulierten Zellen in einer ANOVA und einem anschließendem Post Hoc Test ausgewertet.

In beiden statistischen Verfahren ist  $p$  eine bedingte Wahrscheinlichkeit (4.3.3) und  $\alpha$  die Irrtumswahrscheinlichkeit.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Microsoft Excel 97 genutzt.

#### 4.4.1.2 Photometrische Messung zur Proteinbestimmung

Lösungen:	<b>Proteinstandard</b>	0 $\mu\text{g/ml}$ ; 500 $\mu\text{g/ml}$ ; 1000 $\mu\text{g/ml}$ ;
	<b>(BSA in Aqua dest.)</b>	1500 $\mu\text{g/ml}$ ; 2000 $\mu\text{g/ml}$
	<b>BCA(Bicinchoninsäure)-Assay</b>	Reagenz A
		Reagenz B

Nach der Messung der Fluoreszenzintensitäten im ELISA-Reader wurde eine Proteinbestimmung anhand des BCA-Assays durchgeführt. Dazu wurde eine BSA-Verdünnungsreihe in Aqua dest. hergestellt. Je 25  $\mu\text{l}$  der Proteinstandards wurden als Doppelbestimmung in bisher leere, beschichtete Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Es wurde eine Reagenzlösung des BCA-Assay, bestehend aus 20 ml Reagenz A und 400  $\mu\text{l}$  Reagenz B hergestellt. 200  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden in jedes Well pipettiert. Die Zellen wurden 30 min bei 37°C unter unsterilen Bedingungen inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Messung der Absorption im Absorptionsphotometer bei 540 nm, wobei das Gerät anhand der Proteineichkurve die Proteinkonzentration pro Well errechnete.

Zur Verrechnung mit den Fluoreszenzrohdaten wurden die Mittelwerte der Absorptionsrohdaten berechnet.

#### **4.4.2 Untersuchungen der $TNF\alpha$ -stimulierten CD106-Expression auf SVE4-10-Zellen im Flow-Cytometer (FACS-Analyse)**

Lösungen:	<b>Kulturmedium</b>	siehe 4.2.1
	<b>PBS</b>	siehe 4.2.2
	<b>Trypsin</b>	siehe 4.2.2
	<b>Blockpuffer (BP)</b>	5% BSA in PBS
	<b>Antikörper</b>	<u>Primäre Antikörper</u> ( <b>CD106</b> , <b>Isotyp <math>IgG_1</math></b> ): 1:50 im Blockpuffer verdünnt <u>Sekundärer Antikörper</u> ( <b>Alexa488 anti rat</b> ) 1:100 im Blockpuffer verdünnt

Die Befunde zur verstärkten Expression von CD106 unter Stimulationsbedingungen nach Messung im ELISA-Reader sollten durch eine unabhängige Methode ergänzt werden. Mit der FACS-Analyse wurde dabei eine Methode gewählt, welche die Messung der Fluoreszenzintensitäten einzelner Zellen ermöglicht.

Die Veränderungen der Expression von CD106 nach Stimulation mit 5 beziehungsweise 50 ng/ml  $TNF\alpha$  wurden für jeweils fünf verschiedene Stimulationszeiten im Flow-Cytometer untersucht. Der Präparation der SVE4-10-Zellen wurde dabei das in Abbildung 2 dargestellte Prinzip der Antikörperkopplung zu Grunde gelegt. Es wurden sowohl stimulierte als auch unstimulierte Zellen aufbereitet.

Die Aussaatzellzahlen für die unterschiedlichen Stimulationszeiten wurden aus Tabelle 2 für die neue Wachstumsfläche berechnet. In einer 12,5-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurden die Zellen nach einer Wachstumszeit von 24 h mit 5 beziehungsweise 50 ng/ml  $TNF\alpha$  stimuliert und über 4, 12, 24, 48, beziehungsweise 72 h bei Standardkulturbedingungen inkubiert. Bei den unstimulierten Zellen wurde ein Mediumwechsel ohne Stimulanzzugabe durchgeführt.

Nach beendeter Inkubationszeit wurden die Zellen – wie unter 4.2.2. beschrieben – abgelöst und in Kulturmedium aufgenommen.  $1 \times 10^7$  Zellen wurden bei 300xg 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in PBS aufgenommen. Sowohl die Suspension mit stimulierten Zellen als auch die Zellsuspension mit unstimulierten Zellen wurde auf je

zwei FACS-Röhrchen verteilt. Die Suspensionen wurde bei 300xg 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Sowohl in den stimulierten als auch in den unstimulierten Zellansätzen wurde jeweils ein Pellet in Blockpuffer (BP) mit dem CD106-Antikörper, das andere in BP mit einem Kontrollantikörper des gleichen Isotyps aufgenommen. Es schloss sich eine Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur an. Danach wurden die Suspensionen bei 300xg für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Es erfolgte eine Aufnahme der Pellets in BP mit dem sekundären, Alexa488-markierten Antikörper. Die 30minütige Inkubation fand in Dunkelheit statt. Die Suspensionen wurden anschließend bei 300xg 5 min zentrifugiert, nach Verwerfen des Überstands in PBS aufgenommen und im Flow-Cytometer untersucht. Die Analyse der Zellpopulationen im Vorwärtstreulicht (Größenmessung der Zellen) und Seitwärtstreulicht (Granularitätsmessung der Zellen) (Tabelle 5) stellte sicher, dass nur lebende Zellen bei der anschließenden Messung berücksichtigt wurden.

**Tabelle 5: Parametereinstellung des Flow-Cytometers (FACS) zur fluorometrischen Detektion der sekundär Alexa488-markierten Rezeptoren CD106, CD105 bzw. CD31 auf TNF $\alpha$ -stimulierten und unstimulierten vitalen SVE4-10-Zellen. SSC – Seitwärtstreulicht, FSC – Vorwärtstreulicht, FL-1 – Fluoreszenz 1.**

SSC	FSC	FL 1 – Absorption	FL 1 - Emission
350	E00	486-505 nm	504-541 nm

Pro Messung wurde die Fluoreszenz 1 (FL-1) (Fluoreszenzspektrum von Alexa488) für 10.000 Zellen bestimmt und durch ein Wiederholungsexperiment verifiziert. Als Kontrollen wurden sowohl stimulierte als auch unstimulierte Zellen mit einem Antikörper des gleichen Isotyps inkubiert.

Die Experimente wurden am Flow-Cytometer FACS-Calibur durchgeführt. Die Aufnahme der Daten sowie ihre statistische Auswertung (Fluoreszenzintensitätsmittelwerte) erfolgte mit der im Flow-Cytometer integrierten CellQuest-Software.

#### **4.4.3 Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD106 in SVE4-10-Zellen nach Stimulation mit $TNF\alpha$**

Lösungen: siehe 4.4.1.1

**Eindeckmedium**

50 ng DAPI in 1 ml Permafluor

Auf einem Chamber-Slide wurden nach der unter 4.4.1.1. beschriebenen Beschichtung  $1,4 \times 10^4$  Zellen auf einer Wachstumsfläche von  $0,8 \text{ cm}^2$  ausgesät. Das Experiment wurde bis zum vorletzten Waschgang wie im Abschnitt 4.4.1.1 mit entsprechend größeren Volumina durchgeführt. Nach dem letzten Waschgang erfolgte die Eindeckung der Zellen mit DAPI/Permafluor und einem Deckglas. Nach 6 h wurde das Präparat versiegelt.

Folgende Kontrollen wurden mitgeführt:

- unstimulierte Zellen mit CD-106-Markierung und Alexa-Markierung
- stimulierte Zellen mit Antikörpermarkierung des gleichen Isotyps und Alexa-Markierung
- stimulierte Zellen ohne primären Antikörper aber mit Alexa-Markierung

Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop mit den Filtern WU (330-385 nm) und NB (470-490 nm) sowie im Phasenkontrast. Die Fluoreszenzbilder wurden mit dem Programm DP-Soft (Olympus) aufgenommen und im Photobearbeitungsprogramm Adobe Photoshop 7.0 bearbeitet.

#### 4.5 Elektronenmikroskopischer Nachweis spezifisch an SVE4-10-Zellen gekoppelter Nanopartikel

Lösungen:	<i>Kulturmedium</i>	siehe 4.2.1
	<i>PBS</i>	siehe 4.2.2
	<i>TNF <math>\alpha</math>-Vorverdünnung</i>	1000 ng/ml in PBS (0,1 M, pH 7,2)
	<i>Trypsin/ EDTA-Lösung</i>	siehe 4.2.2
	<i>Trypanblau</i>	siehe 4.2.2
	<i>Separationspuffer (SP), entgast,</i>	2 mM EDTA in PBS
	<i>gekühlt</i>	0,5% biotinfreies BSA
	<i>Primärer Antikörper</i>	CD106, biotinyliert
	<i>Nanopartikel</i>	Streptavidin Micro Beads®
	<i>Fixierlösung</i>	3% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer pH 7,4
	<i>Einbettungsmedium</i>	Durcupan ACM
	<i>Lösung zur Nachfixierung</i>	1%iges, gepuffertes Osmium

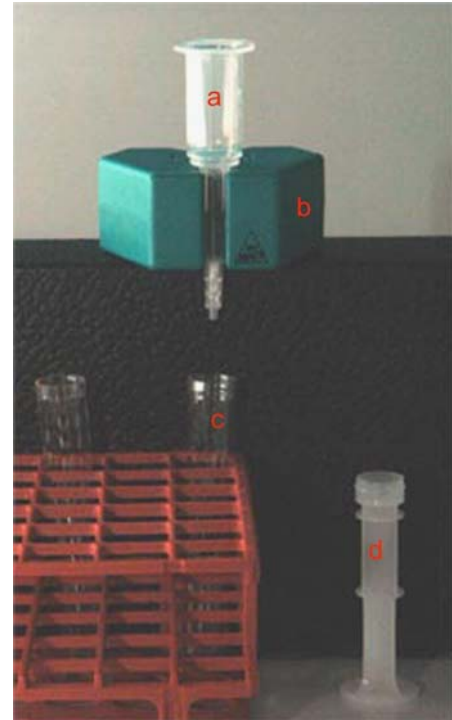
Zur elektronenmikroskopischen Darstellung der spezifischen Kopplung von Nanopartikeln an den CD106-Rezeptor stimulierter SVE4-10-Zellen wurde das Biotin-Streptavidin-System genutzt. Es wurde ein biotinylierter CD106-Antikörper (primärer Antikörper) verwendet, dessen Biotinanteil mit dem Streptavidinanteil der Nanopartikel eine stabile Bindung ergab. Um Unterschiede zur unspezifischen Nanopartikelbindung feststellen zu können, wurde ein Ansatz ohne Zugabe eines primären Antikörpers mitgeführt.

Auf einer Wachstumsfläche von 50 cm<sup>2</sup> wurden 2x10<sup>6</sup> Zellen ausgesät und 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation der Zellen mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  über 24 h bei Standardkulturbedingungen. Danach wurden die Zellen enzymatisch abgelöst. Zwei Ansätze mit jeweils 1x10<sup>7</sup> Zellen wurden vorbereitet, einmal mit PBS gewaschen und in Separationspuffer (SP) aufgenommen. Zur Zellsuspension mit spezifischer Nanopartikelbindung wurden dabei 20  $\mu$ l biotinyliertes CD106 gegeben. Die Zellen zur Darstellung der unspezifischen Bindung wurden nur in 500  $\mu$ l reinem SP aufgenommen. Die Gesamtvolumina beider Ansätze waren identisch. Nach 10minütiger Inkubation der Zellen auf Eis auf dem Rüttler (60 rpm/min) wurden die Zellen zweimal mit SP gewaschen. Nach Aufnahme der Pellets in jeweils 90  $\mu$ l SP wurden zu beiden Zellsuspensionen 10  $\mu$ l Streptavidin Micro Beads® hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine 15minütige Inkubation

der Zellen auf Eis auf dem Rüttler (60 rpm/min). Die Zellen wurden dreimal gewaschen. Danach erfolgte die Trennung der nanopartikelhaltigen Zellen von den nanopartikelfreien Zellen für jeden Ansatz über eine MS-Säule® im magnetischen Feld (Abbildung 3). Dazu wurden die Säulen im Magnetfeld platziert, einmal mit 500 µl SP gespült und mit der jeweiligen Zellsuspension befüllt. Durch dreimaliges Spülen der Zellen in den Säulen mit 500 µl SP wurden die unmarkierten Zellen ausgewaschen. Diese wurden aufgefangen und ausgezählt. Anschließend wurden die Säulen aus dem Magnetfeld entfernt. Das Herauslösen der nanopartikelhaltigen Zellen aus beiden Säulen erfolgte mit 1 ml SP. Das jeweilige Eluat wurde aufgefangen und mit 900 µl Fixierlösung versetzt.

Die fixierten Zellen wurden im Institut für Anatomie I der FSU Jena, damaliger Direktor Prof. Dr. W. Linß, für die Elektronenmikroskopie aufbereitet. Dabei erfolgte vor der Einbettung in Durcupan ACM eine Nachfixierung der Zellen mit 1%igem, gepuffertem Osmium über 30 min. Eine Nachkontrastierung am Ultradünnschnitt wurde mit Uranylacetat und Bleicitrat durchgeführt.

Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden im Programm Adobe Photoshop 7.0 bearbeitet.



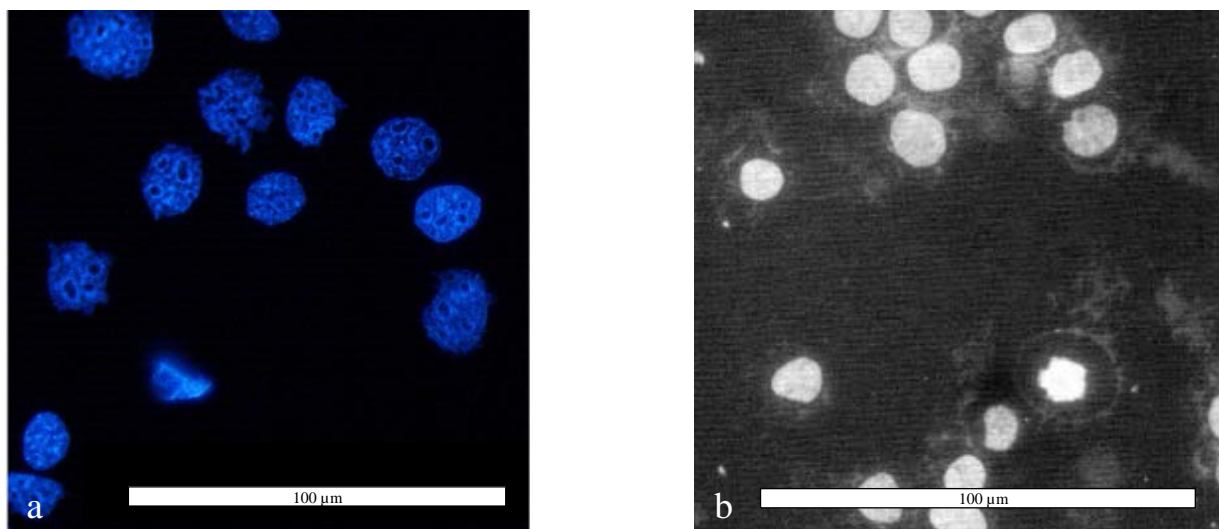
**Abbildung 3:** Versuchsaufbau zur Trennung nanopartikelmarkierter und nicht-markierter SVE4-10-Zellen. Die MS-Säule mit Zellsuspension (a) befindet sich dazu im Magnetfeld eines permanenten Magneten (b). Die unmarkierten Zellen werden im Reagenzglas (c) aufgefangen, während die nanopartikelmarkierten Zellen in der Säule verbleiben. Sie werden außerhalb des Magnetfeldes im Separationspuffer mit Hilfe des Stempels (d) herausgelöst.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Ergebnisse der Voruntersuchungen zur Rezeptormarkierung

#### 5.1.1 Mykoplasmentest

Im Rahmen des DAPI-Tests zum Ausschluss einer Mykoplasmenkontamination der Zellen ließen sich in den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen die deutlich gefärbten Zellkerne der SVE4-10-Zellen scharf gegen das umgebende Zytoplasma abgrenzen. Bei 500facher Vergrößerung waren keine diffusen Fluoreszenzen im Zytoplasma sichtbar (Abbildung 4a). Damit ließen sich die Beobachtungen an SVE4-10-Zellen der vorliegenden Arbeit deutlich von dem Bild Mykoplasmen-kontaminierter Zellen (Abbildung 4b) abgrenzen.



**Abbildung 4:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von a: SVE4-10-Zellen, die mit DAPI (DNA-spezifisch bindendes Fluorochrom) zum Nachweis einer Mykoplasmenkontamination angefärbt wurden (keine Hinweise auf Mykoplasmenanwesenheit sichtbar) und b: DAPI-gefärbter, Mykoplasmen-kontaminierter Zellen (Fibroblasten), deren Zellkerne von diffusen Aufhellungen umgeben sind [LINDL 2000]. Messbalken 100 µm.

### ***5.1.2 Ermittlung der optimalen Aussaatzellzahlen für verschiedene Wachstumszeiten***

Zur optimalen Rezeptormarkierung auf der Basis einer konfluenten Zellkultur vor deren Eintritt in die stationäre Wachstumsphase wurden Aussaatzellzahlen für verschiedene Wachstumszeiten ermittelt. In den Diagrammen der dazu durchgeführten Untersuchungen ist die Aktivität eines Zellenzyms (zelleigene Dehydrogenase) in Abhängigkeit zur ausgesäten Zellzahl für vier verschiedene Wachstumszeiten dargestellt. Die Enzymaktivität verhält sich dabei proportional zur Anzahl der lebenden Zellen in Kultur.

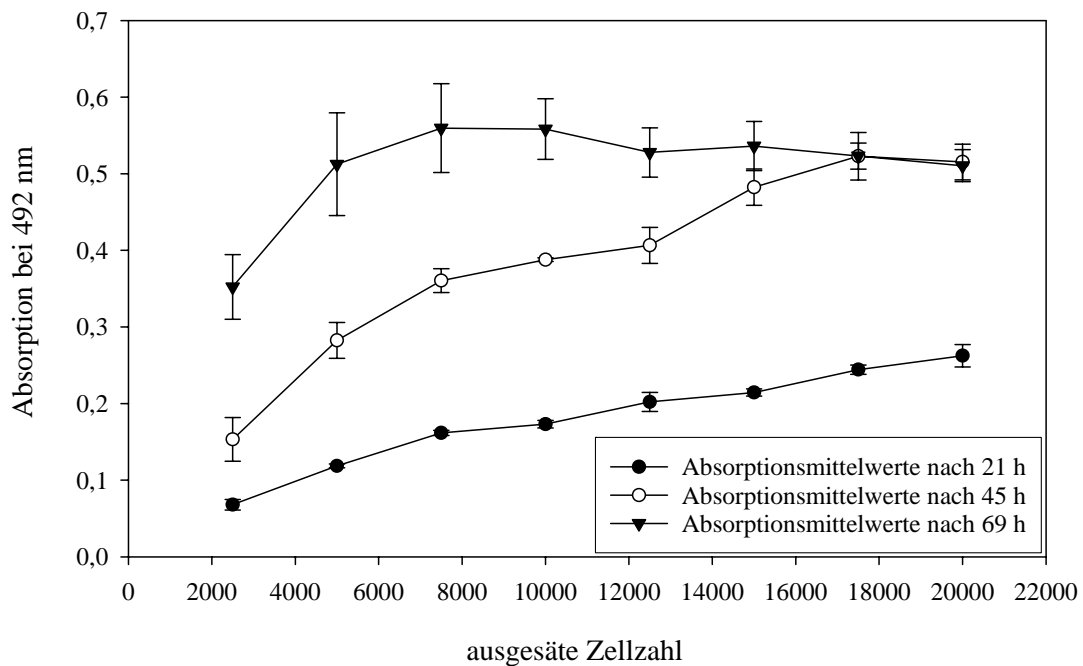
Insgesamt wird deutlich, dass die Enzymaktivität und mit ihr die Größe der Zellpopulation mit steigender Aussaatzellzahl und steigender Wachstumszeit eine Sättigung erreicht. Dies entspricht dem bekannten Wachstumsverhalten von Zellpopulationen.

Nach 21stündigem Wachstum wurde für alle ausgesäten Zellzahlen ein stetiges Wachstum der Zellpopulationen festgestellt.

In der Absorptionsmessung nach einer Wachstumszeit der Zellpopulationen von 45 h wurde hingegen deutlich, dass bis zu einer Aussaatzellzahl von etwa  $1,75 \times 10^4$  Zellen/ Well die Zellpopulationen wuchsen. Bei  $2 \times 10^4$  ausgesäten Zellen/ Well ließ sich jedoch im Vergleich zu einer Aussaatzellzahl von  $1,75 \times 10^4$  Zellen/ Well kein weiteres Wachstum der Zellpopulation beobachten.

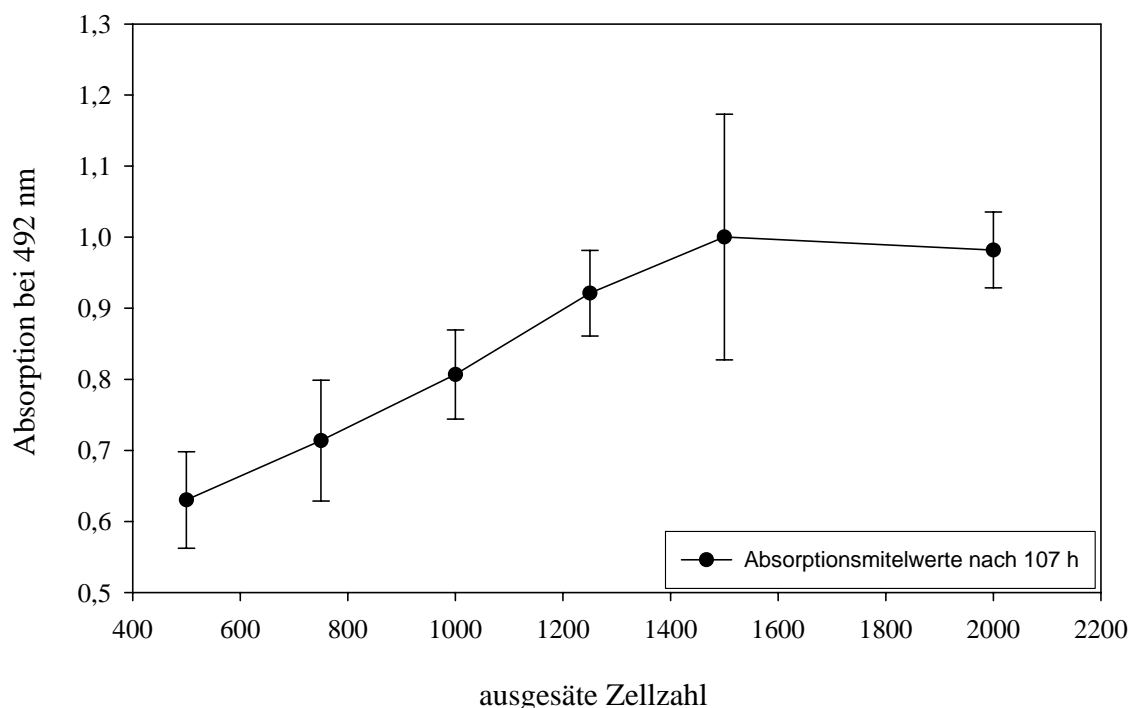
Nach einer Wachstumszeit von 69 h konnte nur bis zu einer Aussaatzellzahl von  $0,75 \times 10^4$  Zellen/ Well ein Wachstum der Zellpopulationen festgestellt werden. In Zellpopulationen mit höheren Aussaatzellzahlen stagnierte das Wachstum bis hin zur Abnahme der Zellpopulation (Abbildung 5).





**Abbildung 5: Darstellung der zellenzymabhängigen (zelleigenen Dehydrogenase) Umsetzung eines Substrats in blaufärbtes Formazan in Abhängigkeit von der ausgesäten SVEC4-10-Zellzahl. Die Ergebnisse wurden für Wachstumszeiten von 21, 45 bzw. 69 h dargestellt. Die Blaufärbung verhält sich proportional zur Anzahl der lebenden Zellen in Kultur. Die abgebildeten Mittelwerte berechnen sich aus jeweils vierfach mitgeführten Ansätzen. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 492 nm.**

Für die Wachstumszeit von 107 h wurden Zellzahlen zwischen  $0,5 \times 10^3$  und  $2 \times 10^3$  Zellen/Well ausgesät. Nach 107 h konnte in den Kulturen mit einer Aussaatzellzahl bis  $1,5 \times 10^3$  Zellen/Well von einem Wachstum der Zellpopulation ausgegangen werden. Zellpopulationen größerer Aussaatzellzahlen als  $1,5 \times 10^3$  Zellen/Well zeigten einen geringeren Anteil vitaler Zellen nach 107 h Wachstum als bei letzterer Aussaatzellzahl (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Darstellung der zellenzymabhängigen (zelleigenen Dehydrogenase) Umsetzung eines Substrats in blaufärbtes Formazan in Abhängigkeit von der ausgesäten SVEC4-10-Zellzahl nach einer Wachstumszeit von 106 h. Die Blaufärbung verhält sich proportional zur Anzahl der lebenden Zellen in Kultur. Die abgebildeten Mittelwerte berechnen sich aus jeweils vierfach mitgeführten Ansätzen. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 492 nm.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse wurden Aussaatzellzahlen für die weiterführenden Untersuchungen festgelegt (Tabelle 6). Dabei setzt sich die Wachstumszeit aus 24 h nativen Zellpopulationswachstums und der anschließenden Stimulationszeit mit TNF $\alpha$  zusammen. Grundlage der Entscheidung bildeten zwei Kriterien. Zum Ende der Wachstumszeit sollte einerseits ein konfluenter Zellrasen vorliegen, andererseits sollte die stationäre Phase des Wachstums der Zellpopulation noch nicht erreicht sein.

**Tabelle 6:** Aussaatzellzahlen der SVE4-10-Zellen pro Well bzw. pro Zellkulturflasche zum Erreichen der optimalen Zellkonfluenz zum Zeitpunkt der Markierung der Oberflächenrezeptoren (CD106, CD105, CD31). Die Wachstumszeiten der Zellpopulationen betragen 28, 36, 48, 72 bzw. 96 h. Den Inkubationszeiten mit TNF $\alpha$  sind dabei 24 h des nativen Zellpopulationswachstums hinzuzufügen.

Inkubationszeit mit TNF $\alpha$ (h)	4	12	24	48	72
Wachstumszeit gesamt (h)	28	36	48	72	96
Aussaatzellzahl/Well (0,33 cm <sup>2</sup> )	14000	12000	8000	5000	1000
Aussaatzellzahl/ Zellkulturflasche (12,5 cm <sup>2</sup> )	$5,3 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$0,38 \times 10^5$

### **5.1.3 Variation von Waschpuffer und Wachstumsmatrix zur Optimierung der Zelladhäsion für die Messungen am ELISA-Reader**

#### **5.1.3.1 Phasenkontrastmikroskopische Beurteilung der Zellen**

Die beste Zelladhäsion ließ sich phasenkontrastmikroskopisch auf allen beschichteten und unbeschichteten Wells bei Behandlung der Zellen mit DMEM beobachten.

In allen *beschichteten Wells* konnten im Bezug auf die Waschpuffer weiterhin gleichartige Tendenzen des Zelladhäsionsverhaltens festgestellt werden. Als optimale Waschpuffer für die bestmögliche Zelladhäsion erwiesen sich dabei die Waschpuffer in folgender, absteigender Reihenfolge:

**DMEM  $\gg$  PBS+Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>, pH7,4  $\gg$  PBS+Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>, pH7,2  $\gg$  PBS, pH7,4  $\gg$  PBS, pH7,2**

In den *unbeschichteten Wells* verminderte sich die Adhärenz der Zellen unter Waschpufferbehandlung (von links nach rechts) wie folgt:

**DMEM  $\gg$  PBS, pH7,4  $\gg$  PBS, pH7,2  $\gg$  PBS+Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>, pH7,4  $\gg$  PBS+Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>, pH7,2**

Auf den Beschichtungen GT (Gelatine im Trockenschrank) und G (Gelatine) wurde die beste Adhäsion der Zellen an der Matrix beobachtet.

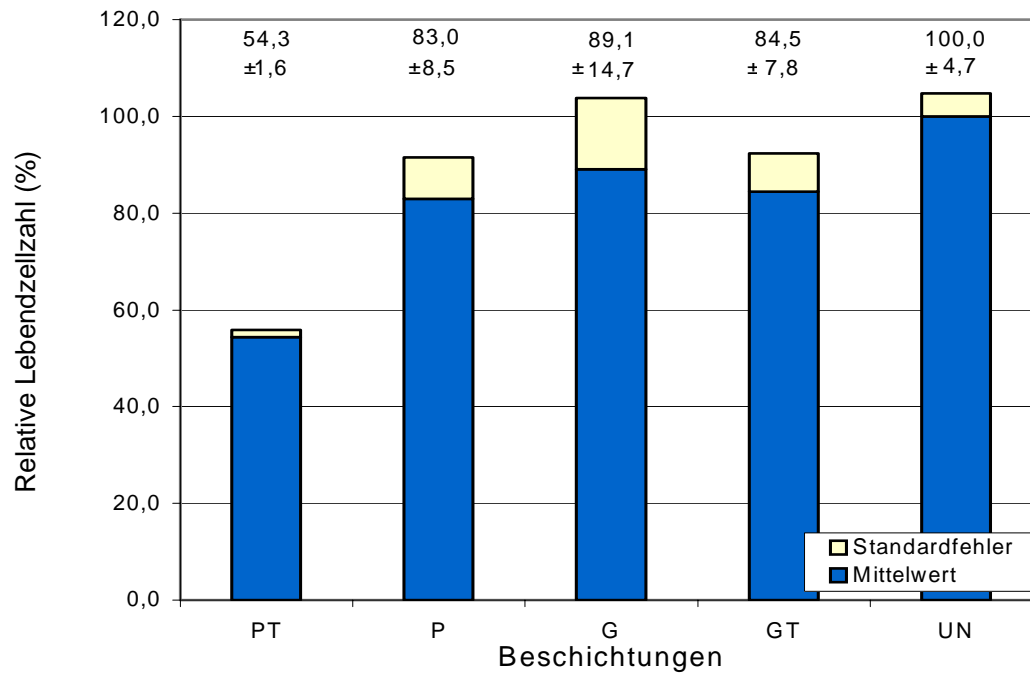
Die Zellbehandlung mit dem Waschpuffer Phosphatpuffer (PB) pH 7,2 und 7,4 zeigte nach der ersten Waschpufferzugabe in allen Wells eine Abrundung der Zellen mit Verlust der Zelladhäsion. Dies führte zu einem vollständigen Zellverlust beim Waschen.

### 5.1.3.2 Ergebnisse der Lebendzellzahlbestimmung nach dem Waschprozess

Die Ergebnisse der Lebendzellzahlbestimmung mit dem Cell Titer 96AQueous One Solution Assay (MTS-Test) wiesen deutliche Unterschiede zwischen den mit verschiedenen Waschpuffern behandelten Zellen auf. In allen beschichteten und unbeschichteten Wells wurden für die in DMEM gewaschenen Zellen die höchsten Lebendzellzahlen gemessen. Für alle anderen Puffer wurde deutlich, dass die zellhaltigen Ansätze keine höheren Absorptionen – und somit Lebendzellzahlen – aufwiesen als die jeweils dazu gehörenden Leerwerte (zellfreier Ansatz mit Waschpuffer und Beschichtung; Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Lebendzellzahlen der in DMEM gewaschenen Zellen wurden in Prozent, bezogen auf die höchste ermittelte Lebendzellzahl, dargestellt (Abbildung 7). Die höchste ermittelte Lebendzellzahl wurde für den Waschpuffer DMEM in den unbeschichteten Wells gemessen. Sie entsprach in dieser Untersuchung einer Lebendzellzahl von 100 % und war somit Bezugsgröße für die weiteren gemessenen Lebendzellzahlen.

In der statistischen Auswertung unterschieden sich die Lebendzellzahlen der Beschichtungen “Poly-L-Lysin” (P) mit  $83 \pm 8,5$  %, “Gelatine” (G) mit  $89,1 \pm 14,7$  %, “Gelatine mit Trockenschränkinkubation” (GT) mit  $84,5 \pm 7,8$  % und “unbeschichtet” (UN) nicht signifikant voneinander. Im Vergleich zu diesen vier Beschichtungen konnte auf der Beschichtung “Poly-L-Lysin mit Trockenschränkinkubation” (PT) eine signifikant geringere Lebendzellzahl gegenüber den vier genannten Matrices nachgewiesen werden (ANOVA, Post Hoc Test, LSD,  $p=0,04$ ,  $\alpha=0,2$  durch Voraussetzungstest).



**Abbildung 7: Relative Lebendzellzahlen der SVE4-10-Zellen, bezogen auf die Zellzahl auf der unbeschichteten Polysterolmatrix (UN). Die Werte wurden nach Wachstum der Zellpopulation auf den Beschichtungen PT (Poly-L-Lysin mit Trockenschränkinkubation), P (Poly-L-Lysin), G (Gelatine), GT (Gelatine mit Trockenschränkinkubation) bzw. UN (unbeschichtet) nach dem Waschprozess mit DMEM ermittelt (MTS-Test). Die abgebildeten Mittelwerte berechnen sich aus jeweils dreifach mitgeführten Ansätzen. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 492 nm.**

Aufgrund der phasenkontrastmikroskopischen Beobachtungen sowie der Lebendzellzahlbestimmung wurde für die immunfluorometrischen Messungen am ELISA-Reader die Beschichtung “Gelatine mit Trockenschränkinkubation” in Kombination mit dem Waschpuffer DMEM ermittelt. Ausschlaggebend hierfür war, dass unter diesen Bedingungen die beste Morphologie der SVE4-10-Zellen beobachtet wurde.

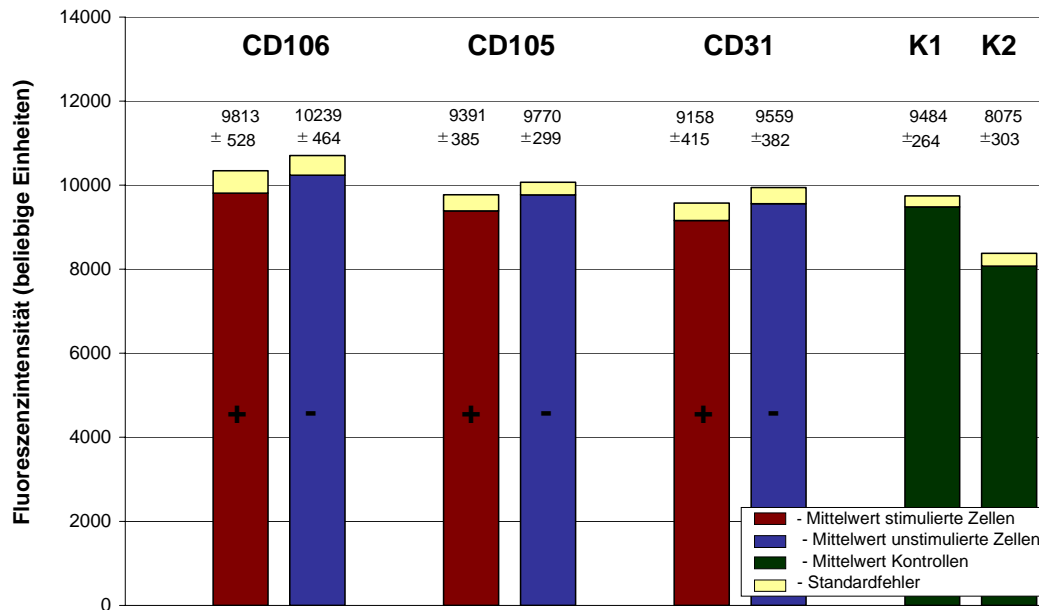
## **5.2 Ergebnisse der Untersuchungen am ELISA-Reader zur Expression von CD106, CD105 und CD31 auf SVE4-10-Zellen nach Stimulation mit TNF $\alpha$**

Nach Stimulation mit TNF $\alpha$  ließ sich auf den SVE4-10-Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen eine verstärkte Expression des Rezeptors CD106 nachweisen. Unter den eingesetzten Versuchsbedingungen waren für die Rezeptoren CD105 und CD31 keine statistisch relevanten, spezifischen Stimulationseffekte nachweisbar. In allen Messungen waren die Fluoreszenzintensitäten des Mediumleerwertes (K2 – Ansatz mit Beschichtung, 0,1% SDS in DMEM) nicht wesentlich geringer als die Fluoreszenzintensitäten der markierten Zellen.

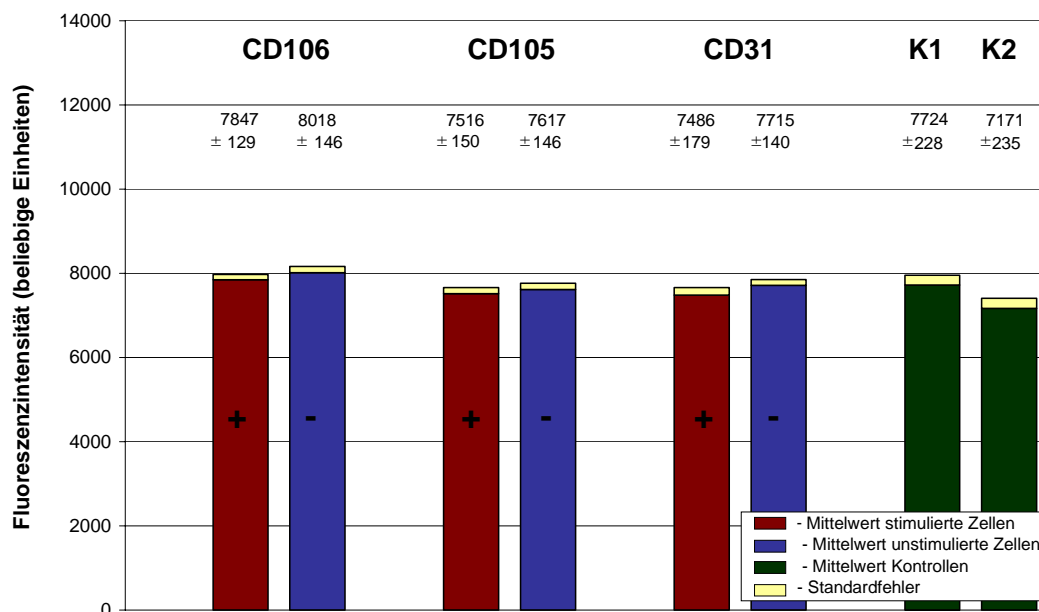
### *5.2.1.1 Stimulation mit 0,05 ng/ml TNF $\alpha$*

Unter Stimulation mit 0,05 ng/ml TNF $\alpha$  zeigte sich nach 4 h (Abbildung 8), 12 h (Abbildung 9), 24 h (Abbildung 10), 48 h (Abbildung 11) beziehungsweise 72 h (Abbildung 12) für keinen der getesteten Rezeptoren eine verstärkte Expression von statistischer Tendenz oder Signifikanz (t-Test,  $\alpha = 0,05$ ).

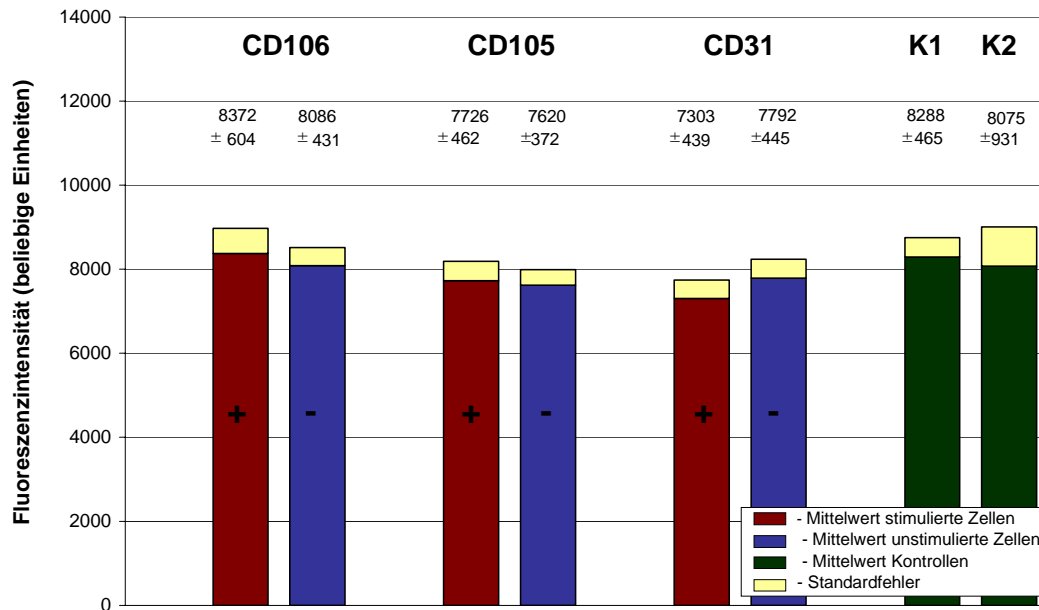
Im Vergleich der *spezifischen Markierungen* der Rezeptoren (CD106, CD105 und CD31) mit unspezifischen Markierungen (Antikörper des gleichen Isotyps) auf stimulierten Zellen ließ sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied feststellen (ANOVA, Post Hoc Test, LSD,  $\alpha = 0,05$ ).



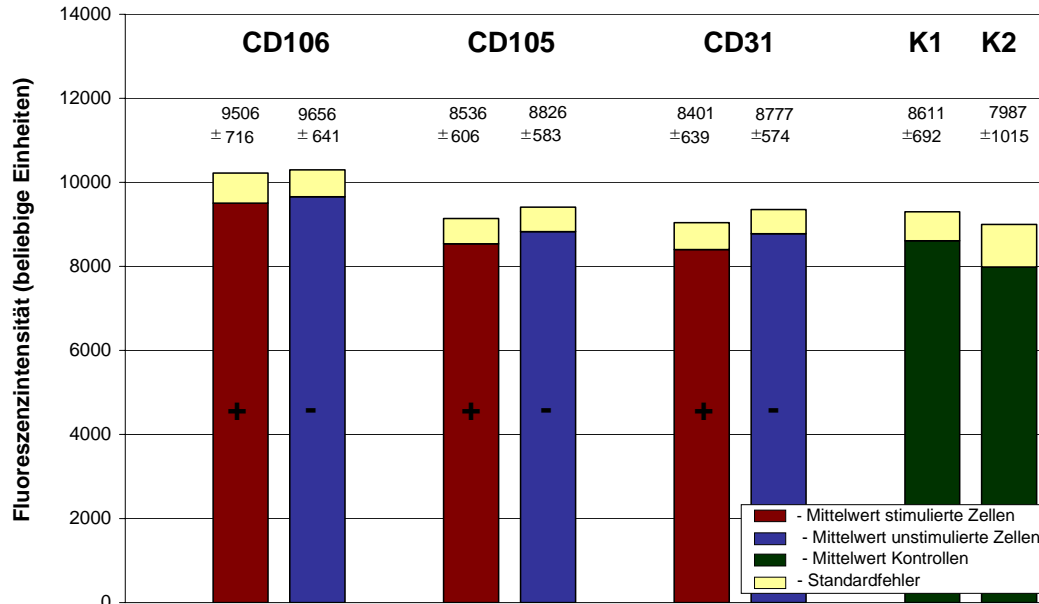
**Abbildung 8:** Nachweis der Expression von CD106, CD105 und CD31 auf stimulierten (+) (0,05 ng/ml TNF $\alpha$ , 4 h) und unstimulierten (-) SVE4-10-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper CD106, CD105 bzw. CD31 wurden mit einem sekundären, Alexa488-gekoppelten Antikörper (Fluoreszenzfarbstoff,  $\lambda_{\text{Absorption}} = 485 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 520 \text{ nm}$ ) markiert. K1: primärer Kontrollantikörper des gleichen Isotyps auf stimulierten Zellen, sekundärer Antikörper, K2: zellfreier Ansatz mit Beschichtung und 0,1% SDS in DMEM. Die dargestellten Mittelwerte setzen sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit sechsfach (spezifische Rezeptoren) bzw. vierfach (Kontrollen) mitgeführten Ansätzen zusammen.



**Abbildung 9:** Nachweis der Expression von CD106, CD105 und CD31 auf stimulierten (+) (0,05 ng/ml TNF $\alpha$ , 12 h) und unstimulierten (-) SVE4-10-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper CD106, CD105 bzw. CD31 wurden mit einem sekundären, Alexa488-gekoppelten Antikörper (Fluoreszenzfarbstoff,  $\lambda_{\text{Absorption}} = 485 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 520 \text{ nm}$ ) markiert. K1: primärer Kontrollantikörper des gleichen Isotyps auf stimulierten Zellen, sekundärer Antikörper, K2: zellfreier Ansatz mit Beschichtung und 0,1% SDS in DMEM. Die dargestellten Mittelwerte setzen sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit sechsfach (spezifische Rezeptoren) bzw. vierfach (Kontrollen) mitgeführten Ansätzen zusammen.

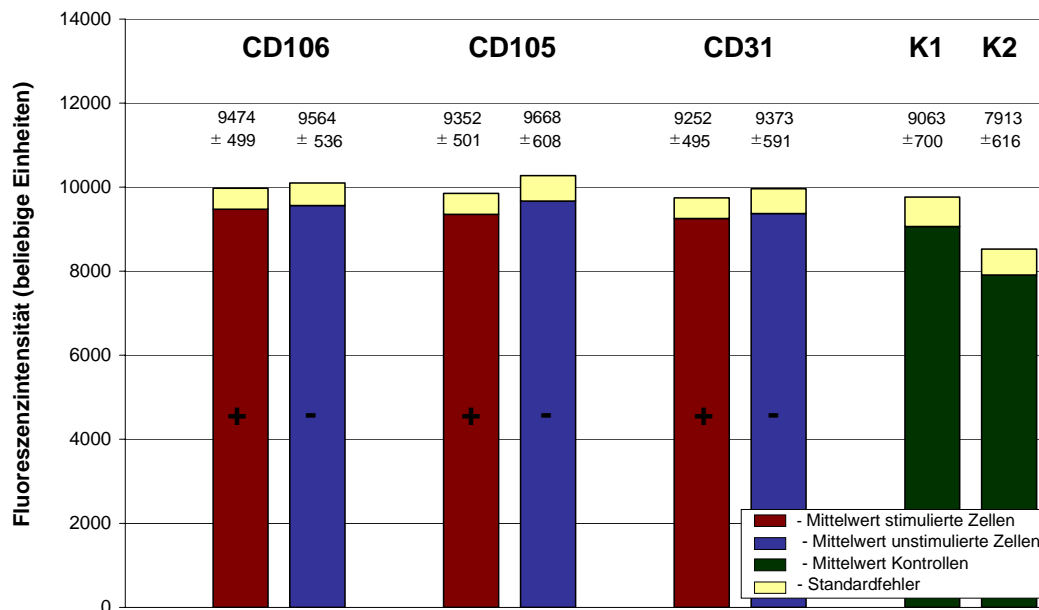


**Abbildung 10:** Nachweis der Expression von CD106, CD105 und CD31 auf stimulierten (+) (0,05 ng/ml TNF $\alpha$ , 24 h) und unstimulierten (-) SVE4-10-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper CD106, CD105 bzw. CD31 wurden mit einem sekundären, Alexa488-gekoppelten Antikörper (Fluoreszenzfarbstoff,  $\lambda_{\text{Absorption}} = 485 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 520 \text{ nm}$ ) markiert. K1: primärer Kontrollantikörper des gleichen Isotyps auf stimulierten Zellen, sekundärer Antikörper, K2: zellfreier Ansatz mit Beschichtung und 0,1% SDS in DMEM. Die dargestellten Mittelwerte setzen sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit sechsfach (spezifische Rezeptoren) bzw. vierfach (Kontrollen) mitgeführten Ansätzen zusammen.



**Abbildung 11:** Nachweis der Expression von CD106, CD105 und CD31 auf stimulierten (+) (0,05 ng/ml TNF $\alpha$ , 48 h) und unstimulierten (-) SVE4-10-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper CD106, CD105 bzw. CD31 wurden mit einem sekundären, Alexa488-gekoppelten Antikörper (Fluoreszenzfarbstoff,  $\lambda_{\text{Absorption}} = 485 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 520 \text{ nm}$ ) markiert. K1: primärer Kontrollantikörper des gleichen Isotyps auf stimulierten Zellen, sekundärer Antikörper, K2: zellfreier Ansatz mit Beschichtung und 0,1% SDS in DMEM. Die dargestellten Mittelwerte setzen sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit sechsfach (spezifische Rezeptoren) bzw. vierfach (Kontrollen) mitgeführten Ansätzen zusammen.





**Abbildung 12:** Nachweis der Expression von CD106, CD105 und CD31 auf stimulierten (+) (0,05 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$ , 72 h) und unstimulierten (-) SVE4-10-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper CD106, CD105 bzw. CD31 wurden mit einem sekundären, Alexa488-gekoppelten Antikörper (Fluoreszenzfarbstoff,  $\lambda_{\text{Absorption}} = 485 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 520 \text{ nm}$ ) markiert. K1: primärer Kontrollantikörper des gleichen Isotyps auf stimulierten Zellen, sekundärer Antikörper, K2: zellfreier Ansatz mit Beschichtung und 0,1% SDS in DMEM. Die dargestellten Mittelwerte setzen sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit sechsfach (spezifische Rezeptoren) bzw. vierfach (Kontrollen) mitgeführten Ansätzen zusammen.

#### 5.2.1.2 Stimulation mit 5 ng/ml $\text{TNF}\alpha$

Bei einer Stimulation mit 5 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  zeigte sich nach 4 h noch keine nachweisbare Expression von CD106, CD105 oder CD31 (Abbildung 13). Die Messung nach 12stündiger Stimulation (5 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$ ) (Abbildung 14) ergab eine tendenziell vermehrte Expression von CD106 (t-Test,  $p=0,071$ ;  $\alpha=0,05$ ). Nach 24 h hingegen war weder signifikant noch tendenziell für CD106 eine vermehrte Expression auf stimulierten Zellen feststellbar (Abbildung 15). In der Messung nach 48 h wurden für CD106 Fluoreszenzintensitäten von  $10273 \pm 624$  beliebigen Einheiten auf stimulierten und  $8809 \pm 297$  beliebigen Einheiten auf unstimulierten Zellen registriert (Abbildung 16). Somit lag eine signifikante Mittelwertsdifferenz von 1464 beliebigen Einheiten vor (t-Test,  $p=0,045$ ;  $\alpha=0,05$ ). CD106 zeigte nach sehr langen Inkubationszeiten (72 h) keine statistisch relevanten Stimulationseffekte.

Für das Oberflächenprotein CD105 wurde eine tendenziell verminderte Fluoreszenzintensität nach 72stündiger Inkubation erfasst (Abbildung 17) (t-Test,  $p=0,072$ ;  $\alpha=0,05$ ). Alle anderen Inkubationszeiten ließen keine signifikanten Unterschiede erkennen.

Die Markierung des Rezeptors CD31 ließ zu keiner Inkubationszeit mit 5 ng/ml TNF $\alpha$  einen statistisch relevanten Effekt zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen deutlich werden.

Die Überprüfung der *Spezifität der Antikörperbindung* auf stimulierten Zellen durch den Vergleich mit der Bindung eines Antikörpers des gleichen Isotyps zeigte keine grundsätzliche Spezifität der Rezeptorbindungen. Im Vergleich der unspezifischen Bindung dieses Antikörpers mit jedem der spezifisch bindenden Antikörper gegen CD106, CD105 und CD31 wurden folgende Unterschiede deutlich:

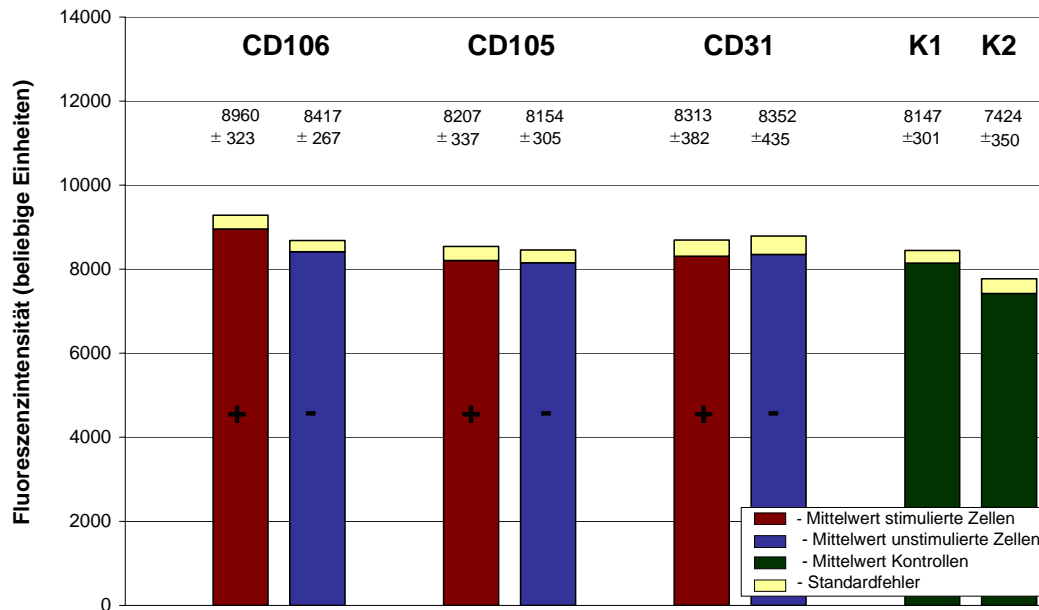
Die ersten Abweichungen waren nach 12stündiger Inkubation mit 5 ng/ml TNF $\alpha$  erfassbar. Es ließ sich für CD106 eine signifikant höhere spezifische Antikörperbindung (ANOVA, Post Hoc Test, LSD,  $p=0,045$ ;  $\alpha=0,05$ ) feststellen. Für CD105 ergab sich eine tendenziell geringere und für CD31 eine signifikant geringere spezifische Antikörperbindung (ANOVA, Post Hoc Test, LSD,  $p=0,08$  beziehungsweise  $p=0,038$ ;  $\alpha=0,05$ ).

Nach 24stündiger Inkubation mit 5 ng/ml TNF $\alpha$  wurde für CD106 keine signifikant höhere Fluoreszenzintensität registriert als für den Kontrollantikörper des gleichen Isotyps. Nach 48 h wurde wiederum eine gegenüber dem Kontrollantikörper signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität für CD106 beobachtet (ANOVA, Post Hoc Test, LSD,  $p=0,000$ ;  $\alpha=0,05$ ).

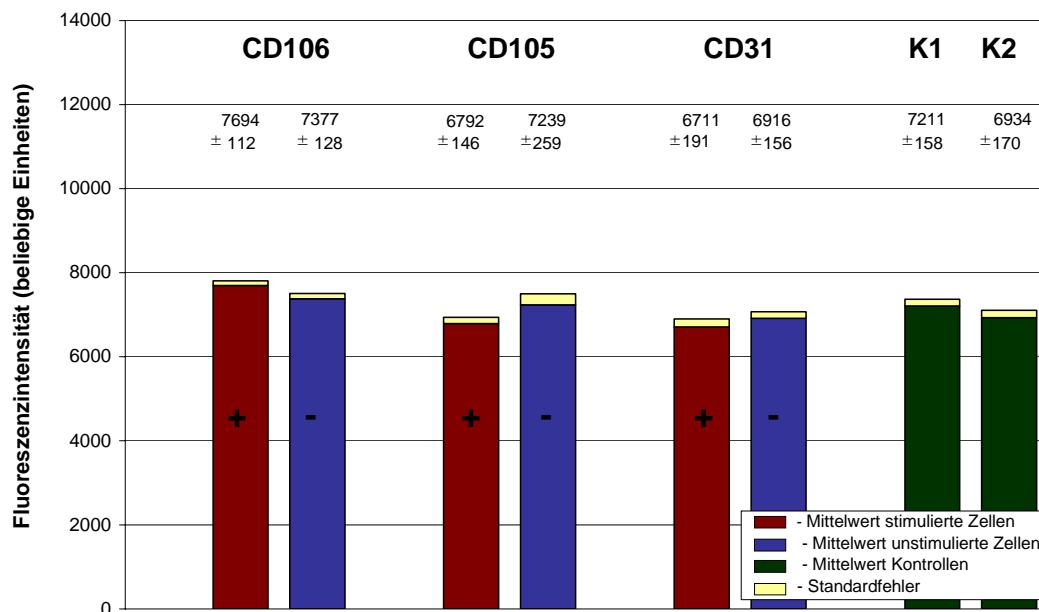
Die 72stündige Inkubationszeit mit 5 ng/ml TNF $\alpha$  wies für alle drei Rezeptoren signifikant höhere Fluoreszenzintensitäten als für den Isotyp auf (ANOVA, Post Hoc Test, LSD, CD106  $p=0,011$ ; CD105  $p=0,016$ ; CD31  $p=0,010$ ;  $\alpha=0,05$ ).

Die für CD106 zu den Inkubationszeiten von 12 beziehungsweise 48 h festgestellten Effekte waren spezifisch. Das zeigt der Vergleich mit dem Antikörper des gleichen Isotyps.

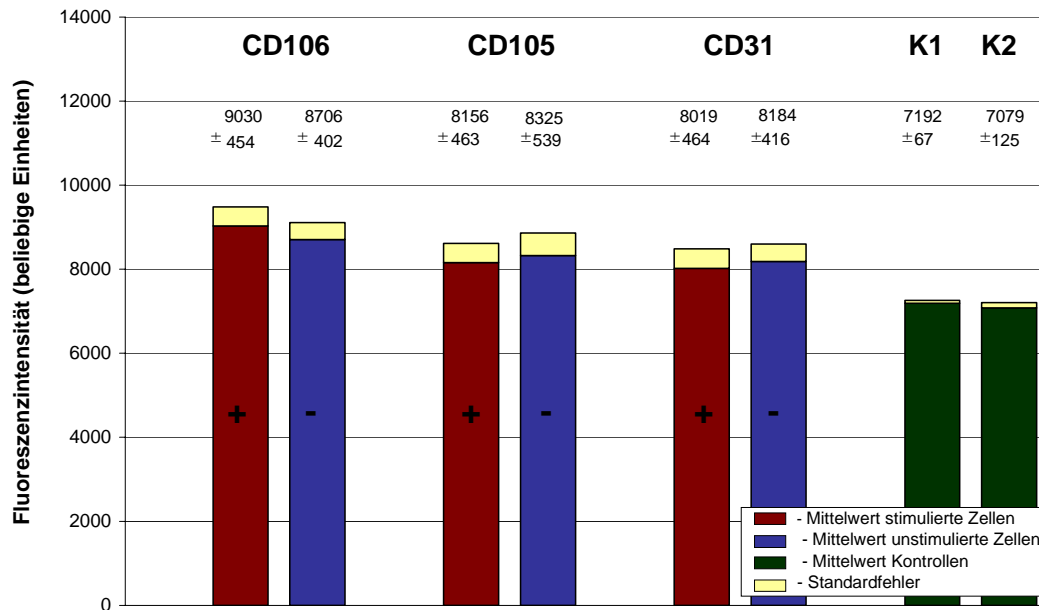
Des weiteren wurde für CD106, CD105 und CD31 die Spezifität der Antikörperbindung auf stimulierten Zellen nach 72 h nachgewiesen. Allerdings bestanden zu diesem Zeitpunkt zwischen der Rezeptorexpression auf stimulierten und unstimulierten Zellen keine signifikanten Unterschiede.



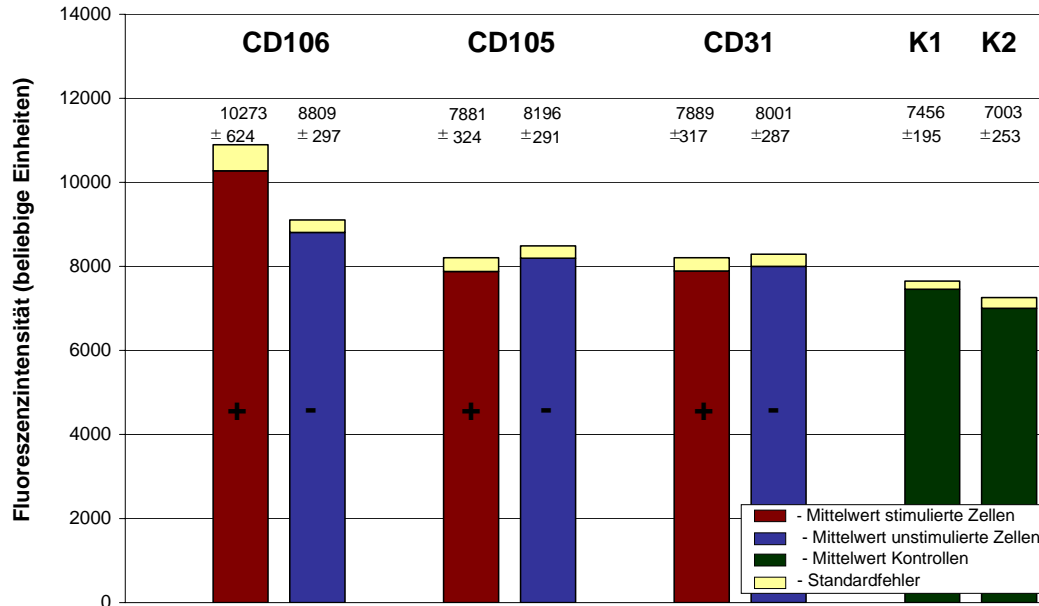
**Abbildung 13:** Nachweis der Expression von CD106, CD105 und CD31 auf stimulierten (+) (5 ng/ml TNF $\alpha$ , 4 h) und unstimulierten (-) SVE4-10-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper CD106, CD105 bzw. CD31 wurden mit einem sekundären, Alexa488-gekoppelten Antikörper (Fluoreszenzfarbstoff,  $\lambda_{\text{Absorption}} = 485 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 520 \text{ nm}$ ) markiert. K1: primärer Kontrollantikörper des gleichen Isotyps auf stimulierten Zellen, sekundärer Antikörper, K2: zellfreier Ansatz mit Beschichtung und 0,1% SDS in DMEM. Die dargestellten Mittelwerte setzen sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit sechsfach (spezifische Rezeptoren) bzw. vierfach (Kontrollen) mitgeführten Ansätzen zusammen.



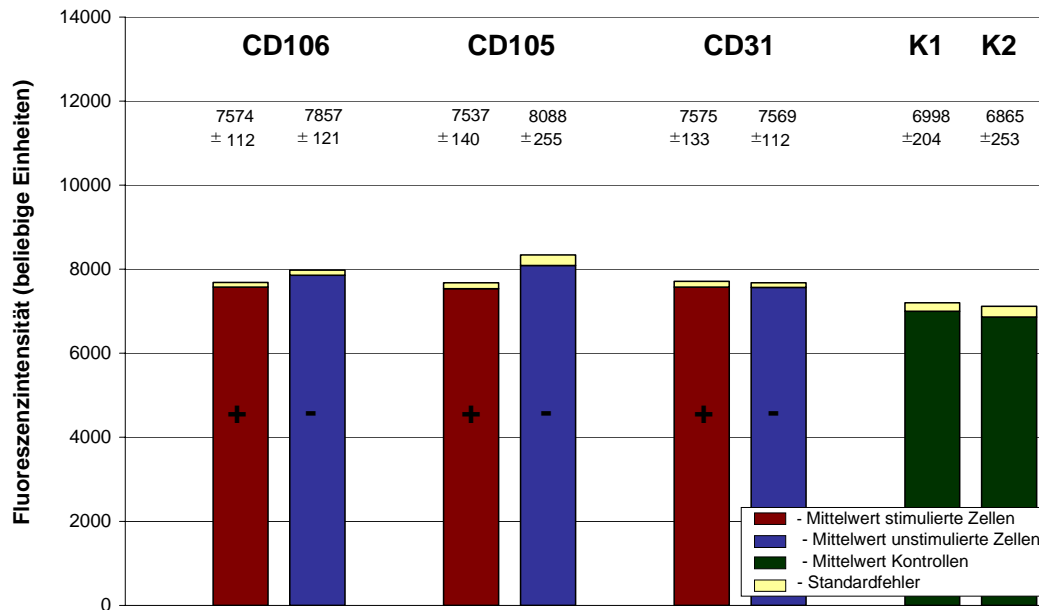
**Abbildung 14:** Nachweis der Expression von CD106, CD105 und CD31 auf stimulierten (+) (5 ng/ml TNF $\alpha$ , 12 h) und unstimulierten (-) SVE4-10-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper CD106, CD105 bzw. CD31 wurden mit einem sekundären, Alexa488-gekoppelten Antikörper (Fluoreszenzfarbstoff,  $\lambda_{\text{Absorption}} = 485 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 520 \text{ nm}$ ) markiert. K1: primärer Kontrollantikörper des gleichen Isotyps auf stimulierten Zellen, sekundärer Antikörper, K2: zellfreier Ansatz mit Beschichtung und 0,1% SDS in DMEM. Die dargestellten Mittelwerte setzen sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit sechsfach (spezifische Rezeptoren) bzw. vierfach (Kontrollen) mitgeführten Ansätzen zusammen.



**Abbildung 15:** Nachweis der Expression von CD106, CD105 und CD31 auf stimulierten (+) (5 ng/ml TNF $\alpha$ , 24 h) und unstimulierten (-) SVE4-10-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper CD106, CD105 bzw. CD31 wurden mit einem sekundären, Alexa488-gekoppelten Antikörper (Fluoreszenzfarbstoff,  $\lambda_{\text{Absorption}} = 485 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 520 \text{ nm}$ ) markiert. K1: primärer Kontrollantikörper des gleichen Isotyps auf stimulierten Zellen, sekundärer Antikörper K2: zellfrei, Beschichtung und 0,1% SDS in DMEM. Die dargestellten Mittelwerte setzen sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit sechsfach (spezifische Rezeptoren) bzw. vierfach (Kontrollen) mitgeführten Ansätzen zusammen.



**Abbildung 16:** Nachweis der Expression von CD106, CD105 und CD31 auf stimulierten (+) (5 ng/ml TNF $\alpha$ , 48 h) und unstimulierten (-) SVE4-10-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper CD106, CD105 bzw. CD31 wurden mit einem sekundären, Alexa488-gekoppelten Antikörper (Fluoreszenzfarbstoff,  $\lambda_{\text{Absorption}} = 485 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 520 \text{ nm}$ ) markiert. K1: primärer Kontrollantikörper des gleichen Isotyps auf stimulierten Zellen, sekundärer Antikörper, K2: zellfreier Ansatz mit Beschichtung und 0,1% SDS in DMEM. Die dargestellten Mittelwerte setzen sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit sechsfach (spezifische Rezeptoren) bzw. vierfach (Kontrollen) mitgeführten Ansätzen zusammen.



**Abbildung 17:** Nachweis der Expression von CD106, CD105 und CD31 auf stimulierten (+) (5 ng/ml TNF $\alpha$ , 72 h) und unstimulierten (-) SVE4-10-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper CD106, CD105 bzw. CD31 wurden mit einem sekundären, Alexa488-gekoppelten Antikörper (Fluoreszenzfarbstoff,  $\lambda_{\text{Absorption}} = 485 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 520 \text{ nm}$ ) markiert. K1: primärer Kontrollantikörper des gleichen Isotyps auf stimulierten Zellen, sekundärer Antikörper, K2: zellfreier Ansatz mit Beschichtung und 0,1% SDS in DMEM. Die dargestellten Mittelwerte setzen sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit sechsfach (spezifische Rezeptoren) bzw. vierfach (Kontrollen) mitgeführten Ansätzen zusammen.

### 5.2.1.3 Stimulation mit 50 ng/ml TNF $\alpha$

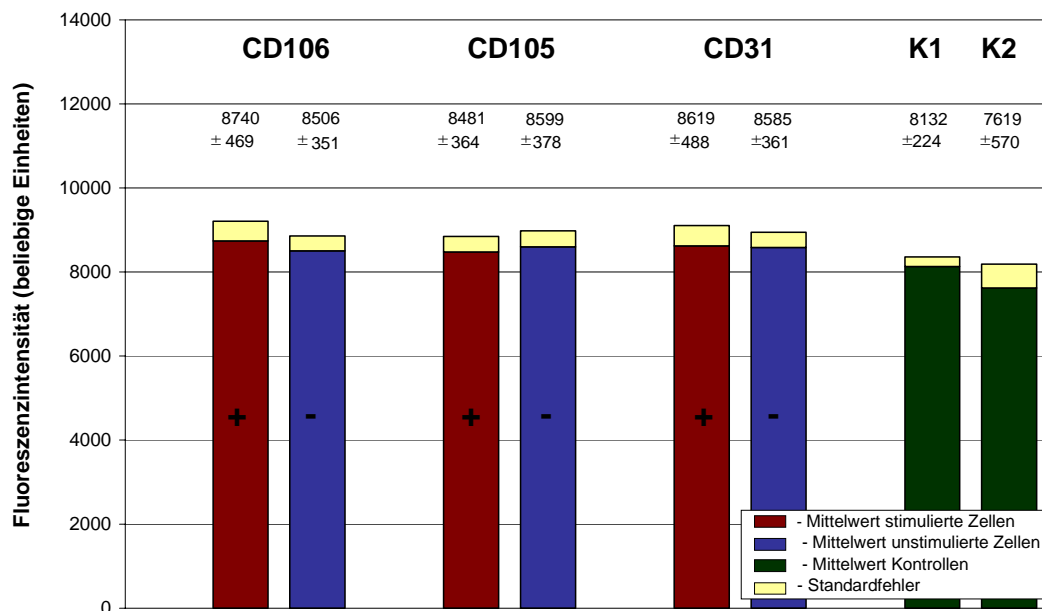
Unter Stimulation mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  ließ sich allein nach einer Inkubationszeit von 24 h eine statistisch relevante, positive Tendenz für CD31 auf stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten SVE4-10-Zellen feststellen (t-Test,  $p=0,062$ ;  $\alpha=0,05$ ). Die unter diesen Parametern gemessenen Fluoreszenzintensitäten zeigten Werte von  $7495 \pm 1469$  beliebigen Einheiten auf stimulierten und  $6542 \pm 234$  beliebigen Einheiten auf unstimulierten Zellen. CD31 wies sonst zu keiner anderen Stimulationszeit statistisch relevante Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen auf.

Für die Rezeptoren CD106 und CD105 war weder nach 4 h (Abbildung 18), 12 h (Abbildung 19) noch nach 24 h (Abbildung 20) eine signifikante oder tendenzielle Erhöhung der Fluoreszenzintensität nach Stimulation mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  erfassbar.

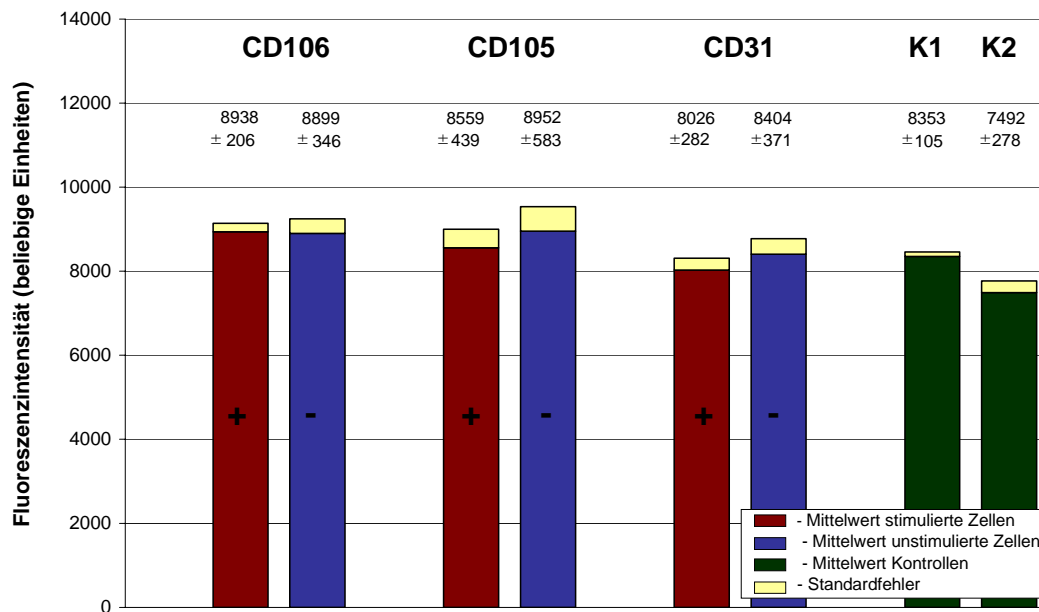
Der Vergleich eines Antikörpers des gleichen Isotyps mit jedem der untersuchten spezifischen Antikörper zur jeweiligen Inkubationszeit (50 ng/ml TNF $\alpha$ ) erbrachte keine statistisch

relevanten Unterschiede. Somit ließ sich auf den stimulierten Zellen (50 ng/ml TNF $\alpha$ ) zu keiner Inkubationszeit eine spezifische Antikörperbindung nachweisen. Damit ist auch die für CD31 nach 24 h im t-Test (stimulierte gegen unstimulierte Zellen) ermittelte Tendenz nicht spezifisch und somit nicht relevant.

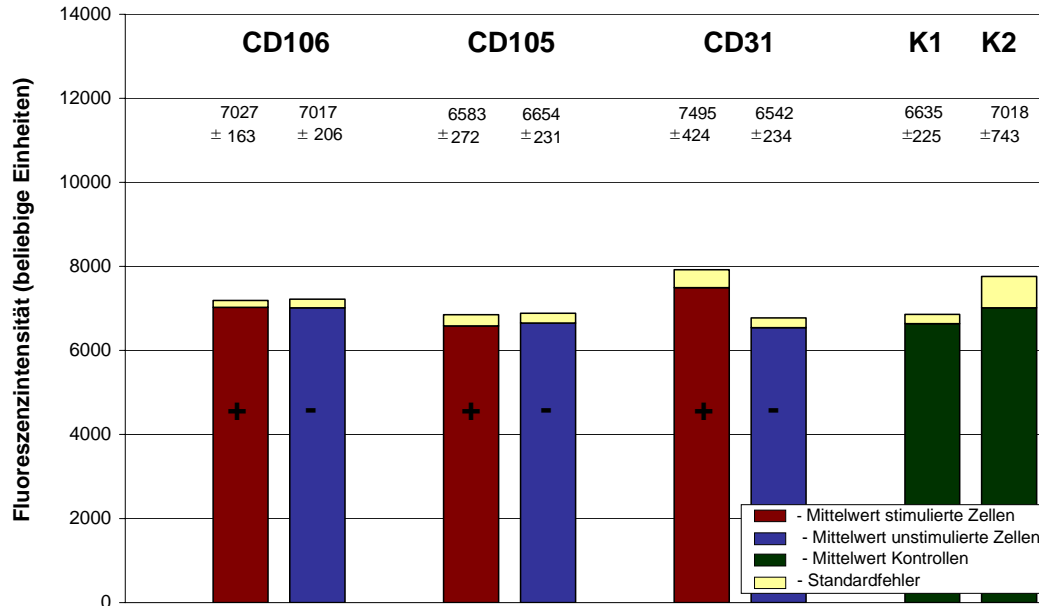
Nach Inkubationszeiten von 48 h beziehungsweise 72 h mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  wurde in der mikroskopischen Kontrolle das Absterben fast aller stimulierten Zellen festgestellt. Dies führte während der ersten Waschvorgänge zum vollständigen Zellverlust in den entsprechenden Ansätzen. Aus diesem Grund wurden keine Werte für diese Stimulationszeiten dargestellt.



**Abbildung 18:** Nachweis der Expression von CD106, CD105 und CD31 auf stimulierten (+) (50 ng/ml TNF $\alpha$ , 4 h) und unstimulierten (-) SVE4-10-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper CD106, CD105 bzw. CD31 wurden mit einem sekundären, Alexa488-gekoppelten Antikörper (Fluoreszenzfarbstoff,  $\lambda_{\text{Absorption}} = 485 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 520 \text{ nm}$ ) markiert. K1: primärer Kontrollantikörper des gleichen Isotyps auf stimulierten Zellen, sekundärer Antikörper, K2: zellfreier Ansatz mit Beschichtung und 0,1% SDS in DMEM. Die dargestellten Mittelwerte setzen sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit sechsfach (spezifische Rezeptoren) bzw. vierfach (Kontrollen) mitgeführten Ansätzen zusammen.



**Abbildung 19:** Nachweis der Expression von CD106, CD105 und CD31 auf stimulierten (+) (5 ng/ml TNF $\alpha$ , 12 h) und unstimulierten (-) SVE4-10-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper CD106, CD105 bzw. CD31 wurden mit einem sekundären, Alexa488-gekoppelten Antikörper (Fluoreszenzfarbstoff,  $\lambda_{\text{Absorption}} = 485 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 520 \text{ nm}$ ) markiert. K1: primärer Kontrollantikörper des gleichen Isotyps auf stimulierten Zellen, sekundärer Antikörper, K2: zellfreier Ansatz mit Beschichtung und 0,1% SDS in DMEM. Die dargestellten Mittelwerte setzen sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit sechsfach (spezifische Rezeptoren) bzw. vierfach (Kontrollen) mitgeführten Ansätzen zusammen.



**Abbildung 20:** Nachweis der Expression von CD106, CD105 und CD31 auf stimulierten (+) (5 ng/ml TNF $\alpha$ , 24 h) und unstimulierten (-) SVE4-10-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper CD106, CD105 bzw. CD31 wurden mit einem sekundären, Alexa488-gekoppelten Antikörper (Fluoreszenzfarbstoff,  $\lambda_{\text{Absorption}} = 485 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 520 \text{ nm}$ ) markiert. K1: primärer Kontrollantikörper des gleichen Isotyps auf stimulierten Zellen, sekundärer Antikörper, K2: zellfreier Ansatz mit Beschichtung und 0,1% SDS in DMEM. Die dargestellten Mittelwerte setzen sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit sechsfach (spezifische Rezeptoren) bzw. vierfach (Kontrollen) mitgeführten Ansätzen zusammen.

### 5.3 Ergebnisse der flowcytometrischen Untersuchung der CD106-Expression auf SVE4-10-Zellen nach Stimulation mit TNF $\alpha$

Zur Verifizierung der im ELISA-Reader beobachteten TNF $\alpha$ -Stimulierbarkeit der Expression von CD106 mit einer unabhängigen Methode wurde die FACS-Analyse gewählt.

#### 5.3.1 Stimulation mit 5 ng/ml TNF $\alpha$

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der CD106-Expression nach Stimulation mit 5 ng/ml TNF $\alpha$  zeigte eine deutliche zeitabhängige Dynamik. Nach 4stündiger Stimulation mit TNF $\alpha$  überlappten die Histogramme der Fluoreszenzintensitäten auf CD106-markierten stimulierten und unstimulierten Zellen fast vollständig (Abbildung 21). Auch die Mittelwerte dieser Fluoreszenzintensitäten wiesen nur einen geringen Unterschied auf. Ähnliche stark überlappende Histogramme der CD106-Markierung auf stimulierten und unstimulierten Zellen zeigten sich nach 12 h (Abbildung 22). Der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten stimulierter Zellen war jedoch hier bereits um den *Faktor 1,7* höher als der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten unstimulierter Zellen (Tabelle 7).

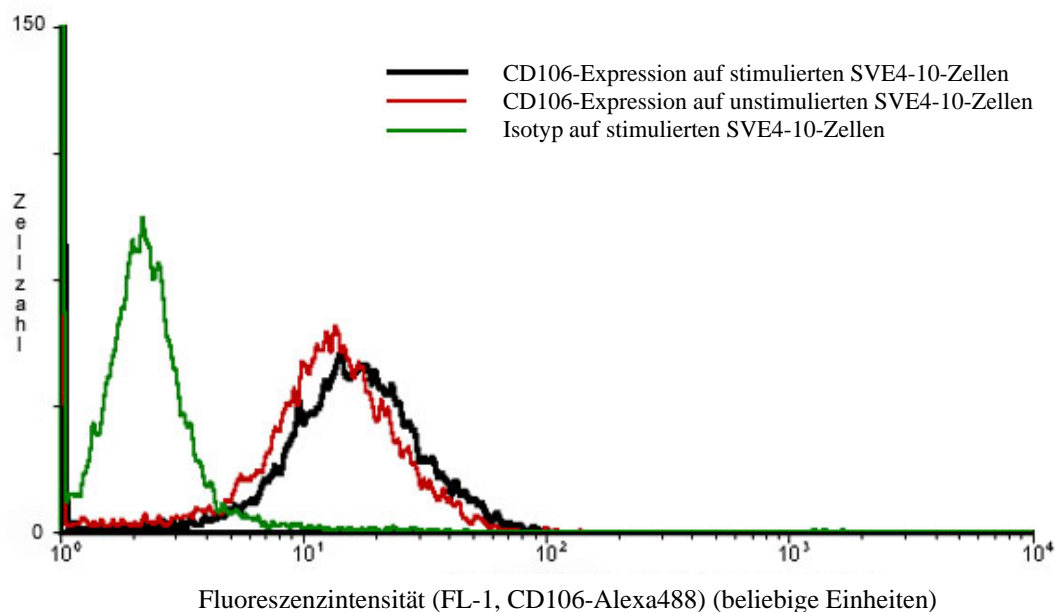
Die Ergebnisse der Messung des 24-h-Wertes zeigten ein Maximum der CD106-Expression unter Stimulation mit 5 ng/ml TNF $\alpha$ . Mit Mittelwerten der Fluoreszenzintensitäten von 42 beliebigen Einheiten für stimulierte und 19 beliebigen Einheiten für unstimulierte Zellen wurde auf stimulierten CD106-markierten Zellen die *2,2fache Fluoreszenzintensität* im Vergleich zu unstimulierten Zellen gemessen (Tabelle 7). Die Kurvenverläufe der beiden erwähnten Ansätze überlagerten sich nur geringfügig (Abbildung 23). Nach 48 h konnte nur noch eine Erhöhung der Fluoreszenzintensitäten auf den stimulierten Zellen gegenüber unstimulierten Zellen um den *Faktor 1,7* festgestellt werden (Abbildung 24). Sie reduzierte sich weiter auf das *1,5fache* mit Fluoreszenzmittelwerten von 20 beliebigen Einheiten für unstimulierte und 32 beliebigen Einheiten für stimulierte Zellen in der Messung nach 72 h (Abbildung 25). Die Histogramme der markierten stimulierten und unstimulierten Zellen überlappten sich dabei weitflächig.

Die CD106-Expression auf unstimulierten Zellen stellte sich über alle Inkubationszeiten relativ einheitlich dar und erreichte stets Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten zwischen 10 und 30 Einheiten (Tabelle 7).

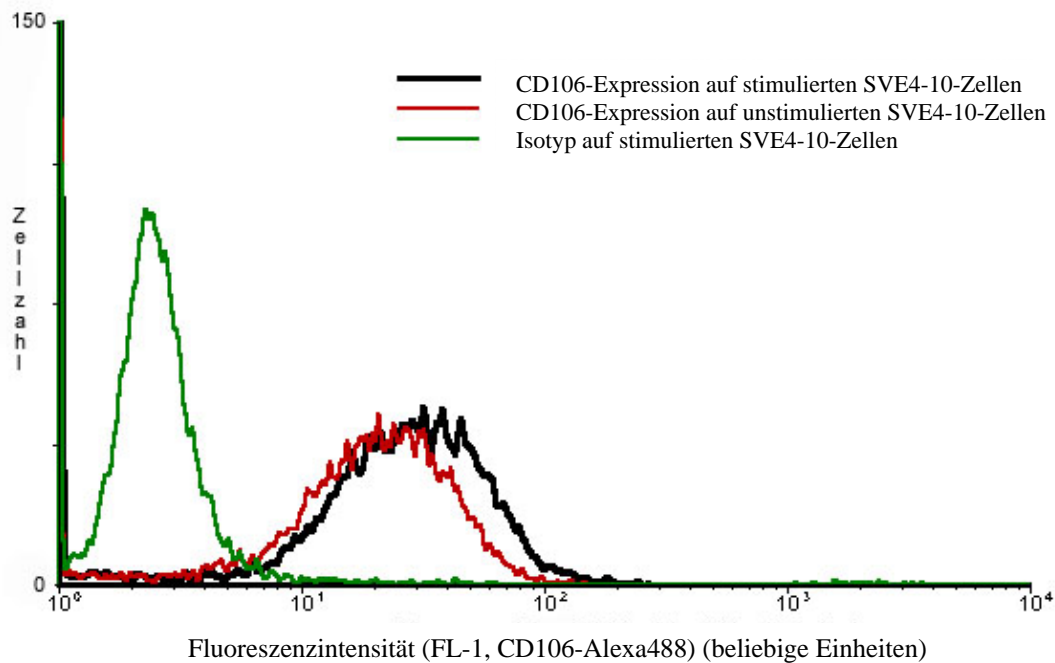


**Tabelle 7: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten unstimulierter und stimulierter (5 ng/ml TNF $\alpha$ ) SVE4-10-Zellen nach Markierung mit einem CD106-Antikörper bzw. mit einem Antikörper des gleichen Isotyps und anschließender Zugabe eines sekundären fluoreszierenden Antikörpers (Alexa488). Die Ergebnisse wurden im Wiederholungsexperiment bestätigt. Aus den Fluoreszenzintensitätsmittelwerten der CD106-Markierungen auf stimulierten und unstimulierten SVE4-10-Zellen wurden Differenzen gebildet. Sie geben den Faktor der vermehrten Expression von CD106 auf stimulierten Zellen an.**

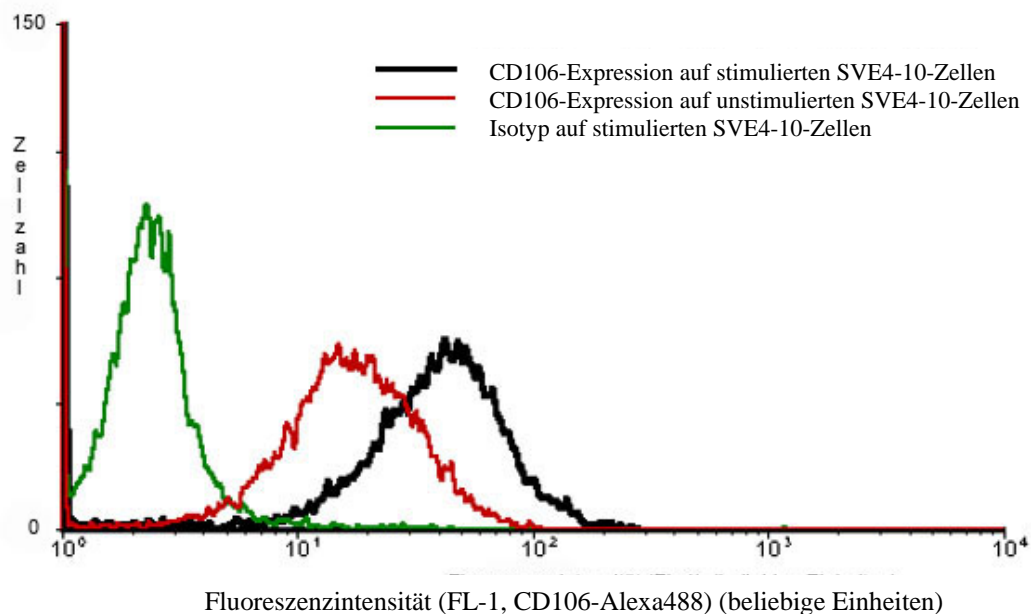
Inkubationszeit (h)	4	12	24	48	72
Unstimulierte Zellen Isotyp	8,2	20,4	10,7	4,8	24,3
Unstimulierte Zellen CD106	13,7	18,0	19,0	27,3	20,5
Stimulierte Zellen CD106	16,2	30,1	41,7	45,3	31,6
Fluoreszenzintensität stimuliert (CD106)/unstimuliert (CD106)	1,2	1,7	2,2	1,7	1,5



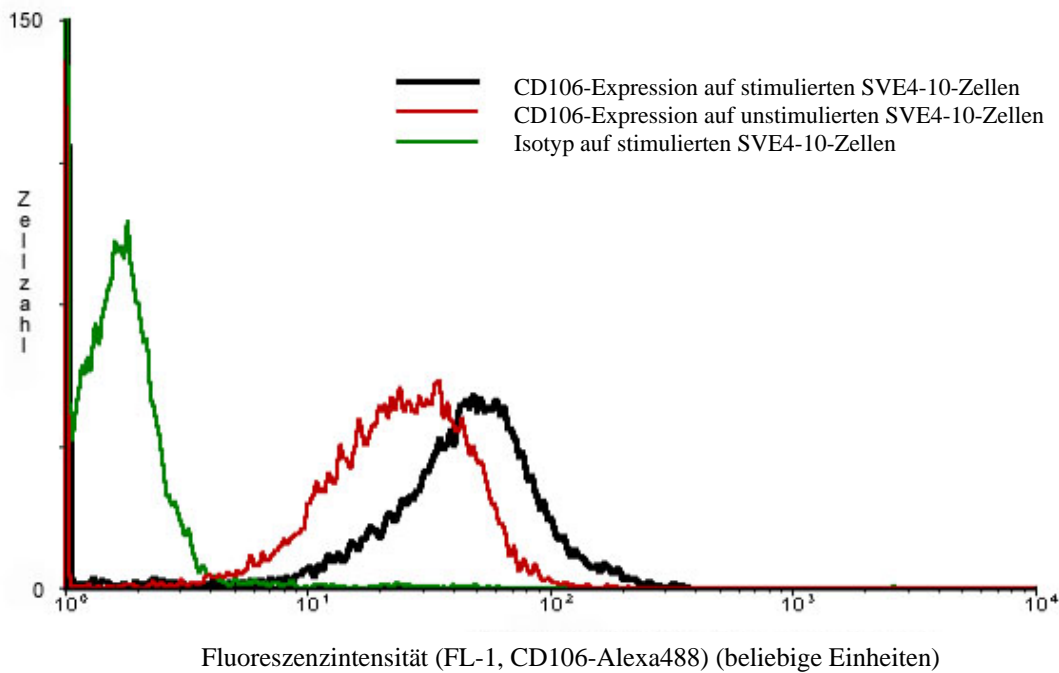
**Abbildung 21: Nachweis der CD106-Expression auf unstimulierten (rot) und stimulierten (5 ng/ml TNF $\alpha$ , 4 h) (schwarz) SVE4-10-Zellen anhand der FACS-Analyse. Ein Antikörper des gleichen Isotyps (grün) wurde mitgeführt. Die primären Antikörper wurden mit einem sekundären fluoreszierenden Antikörper (Alexa488) markiert. Es wurde mit den Wellenlängen  $\lambda_{\text{Absorption}} = 486\text{--}505\text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 504\text{--}541\text{ nm}$  gearbeitet. Die Fluoreszenzintensität wurde logarithmisch aufgetragen, die Zellzahl linear.**



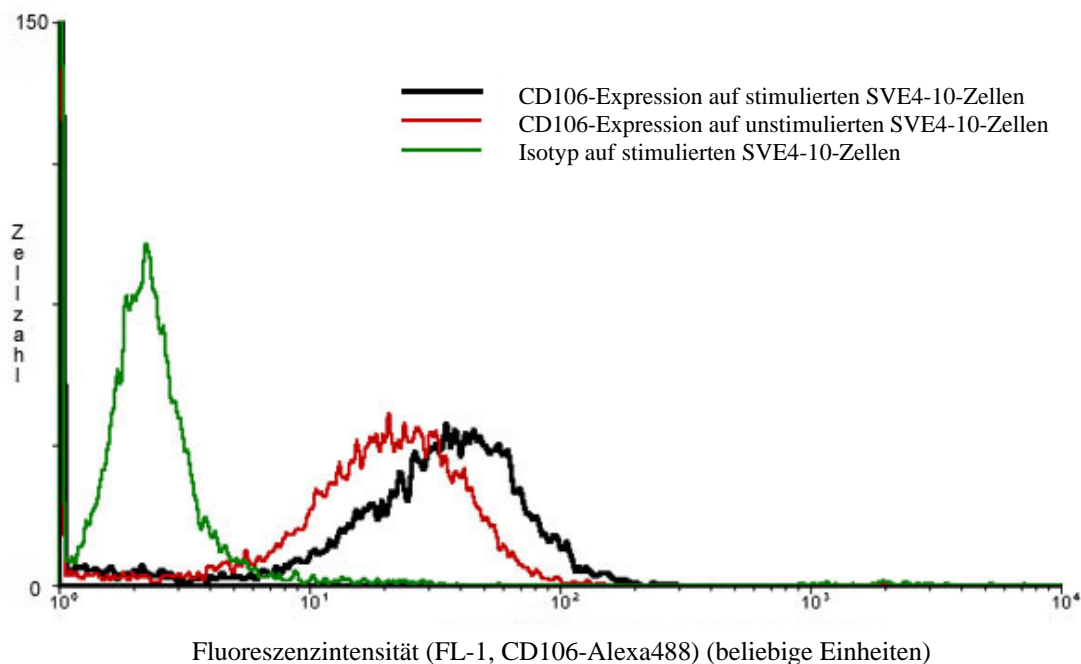
**Abbildung 22:** Nachweis der CD106-Expression auf unstimulierten (rot) und stimulierten (5 ng/ml TNF $\alpha$ , 12 h) (schwarz) SVE4-10-Zellen anhand der FACS-Analyse. Ein Antikörper des gleichen Isotyps (grün) wurde mitgeführt. Die primären Antikörper wurden mit einem sekundären fluoreszierenden Antikörper (Alexa488) markiert. Es wurde mit den Wellenlängen  $\lambda_{\text{Absorption}} = 486\text{-}505\text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 504\text{-}541\text{ nm}$  gearbeitet. Die Fluoreszenzintensität wurde logarithmisch aufgetragen, die Zellzahl linear.



**Abbildung 23:** Nachweis der CD106-Expression auf unstimulierten (rot) und stimulierten (5 ng/ml TNF $\alpha$ , 24 h) (schwarz) SVE4-10-Zellen anhand der FACS-Analyse. Ein Antikörper des gleichen Isotyps (grün) wurde mitgeführt. Die primären Antikörper wurden mit einem sekundären fluoreszierenden Antikörper (Alexa488) markiert. Es wurde mit den Wellenlängen  $\lambda_{\text{Absorption}} = 486\text{-}505\text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 504\text{-}541\text{ nm}$  gearbeitet. Die Fluoreszenzintensität wurde logarithmisch aufgetragen, die Zellzahl linear.



**Abbildung 24:** Nachweis der CD106-Expression auf unstimulierten (rot) und stimulierten (5 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$ , 48 h) (schwarz) SVE4-10-Zellen anhand der FACS-Analyse. Ein Antikörper des gleichen Isotyps (grün) wurde mitgeführt. Die primären Antikörper wurden mit einem sekundären fluoreszierenden Antikörper (Alexa488) markiert. Es wurde mit den Wellenlängen  $\lambda_{\text{Absorption}} = 486\text{-}505\text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 504\text{-}541\text{ nm}$  gearbeitet. Die Fluoreszenzintensität wurde logarithmisch aufgetragen, die Zellzahl linear.



**Abbildung 25:** Nachweis der CD106-Expression auf unstimulierten (rot) und stimulierten (5 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$ , 72 h) (schwarz) SVE4-10-Zellen anhand der FACS-Analyse. Ein Antikörper des gleichen Isotyps (grün) wurde mitgeführt. Die primären Antikörper wurden mit einem sekundären fluoreszierenden Antikörper (Alexa488) markiert. Es wurde mit den Wellenlängen  $\lambda_{\text{Absorption}} = 486\text{-}505\text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 504\text{-}541\text{ nm}$  gearbeitet. Die Fluoreszenzintensität wurde logarithmisch aufgetragen, die Zellzahl linear.

### 5.3.2 Stimulation mit 50 ng/ml TNF $\alpha$

Unter Stimulation mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  ließ sich bereits nach 4stündiger Inkubation eine vermehrte Expression des CD106-Rezeptors verzeichnen. Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten betrugen 29 beliebige Einheiten für stimulierte und 14 beliebige Einheiten für unstimulierte Zellen (Tabelle 8). Somit bestand bereits nach 4stündiger Inkubation (50 ng/ml TNF $\alpha$ ) bei mäßiger Überlagerung der Histogramme eine *2,1fach erhöhte* Rezeptorexpression auf stimulierten Zellen (Abbildung 26).

Die 12-h-Messung zeigte Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten von 46 beliebigen Einheiten für stimulierte und 14 beliebigen Einheiten für unstimulierte Zellen (Abbildung 27). Folglich war die CD106-Expression bei geringer Überlagerung der Histogramme um den *Faktor 2,7* erhöht.

Nach 24 h lag ein Verhältnis der Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten von 95 beliebigen Einheiten auf stimulierten Zellen zu 19 beliebigen Einheiten auf unstimulierten Zellen vor. Somit wurde eine Erhöhung der CD106-Expression auf das *5fache* festgestellt. Die Histogramme der markierten stimulierten und unstimulierten Zellen überlagerten sich kaum (Abbildung 28). Die stetige Steigerung der CD106-Expression mit zunehmender Inkubationszeit hatte damit nach 24 h ihr Maximum erreicht.

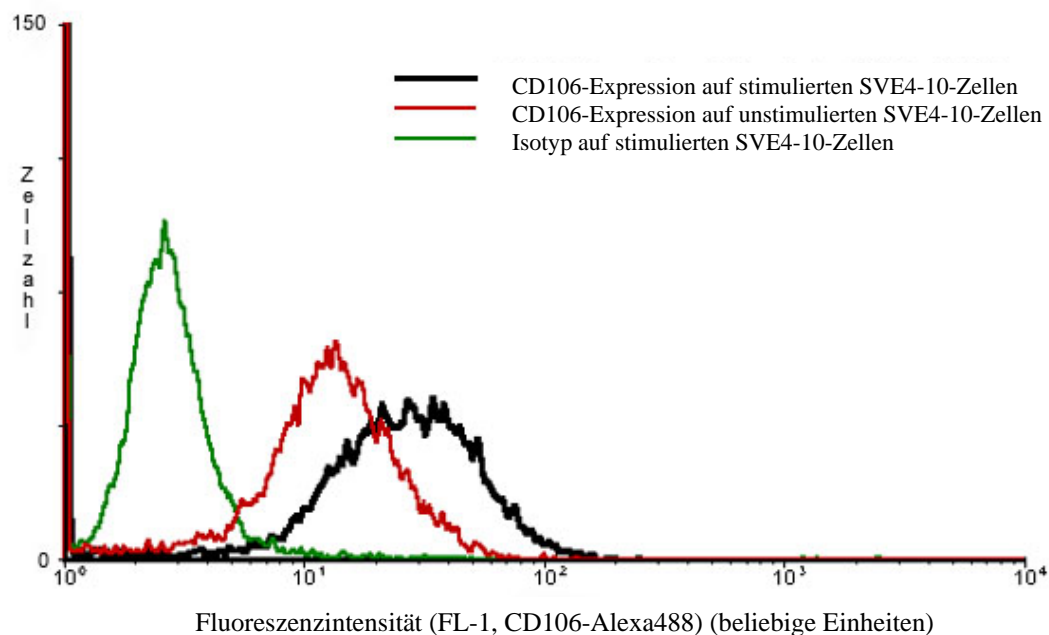
Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten nach 48 h wiesen für stimulierte Zellen 99 beliebige Einheiten und für unstimulierte Zellen 24 beliebige Einheiten auf. Die Stimulation verursachte somit an der Zelloberfläche eine Erhöhung der CD106-Rezeptoren auf das *4,1fache* (Abbildung 29). Diese Inkubationszeit wies ebenfalls nur eine geringe Überlagerung der einzelnen Histogramme auf.

Völlig gegensätzlich stellte sich die Messung nach 72 h dar (Abbildung 30). Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten ließen eine *1,6fach* erhöhte Expression von CD106 erkennen. Dabei kam es zu einer starken Überlagerung der Histogramme für markierte stimulierte und unstimulierte Zellen. Es lag somit nach 72 h eine weniger gesteigerte Expression von CD106 als nach 4 h vor.

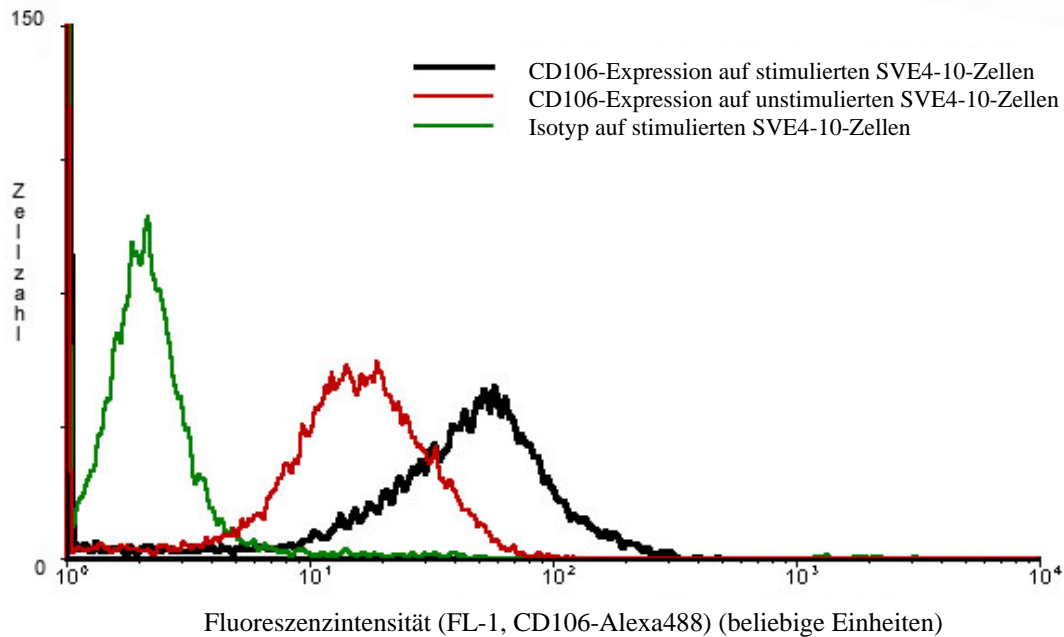
Die Untersuchung der CD106-Markierung auf unstimulierten Zellen zeigte stets Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten zwischen 10 und 25 beliebigen Einheiten, womit eine relativ geringe, homogene CD106-Expression auf diesen Zellen nachgewiesen werden konnte.

**Tabelle 8: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten unstimulierter und stimulierter (50 ng/ml TNF $\alpha$ ) SVE4-10-Zellen nach Markierung mit einem CD106-Antikörper bzw. mit einem Antikörper des gleichen Isotyps und anschließender Zugabe eines sekundären fluoreszierenden Antikörpers (Alexa488). Die Ergebnisse wurden im Wiederholungsexperiment bestätigt. Aus den Fluoreszenzintensitätsmittelwerten der CD106-Markierungen auf stimulierten und unstimulierten SVE4-10-Zellen wurden Differenzen gebildet. Sie geben den Faktor der vermehrten Expression von CD106 auf stimulierten Zellen an.**

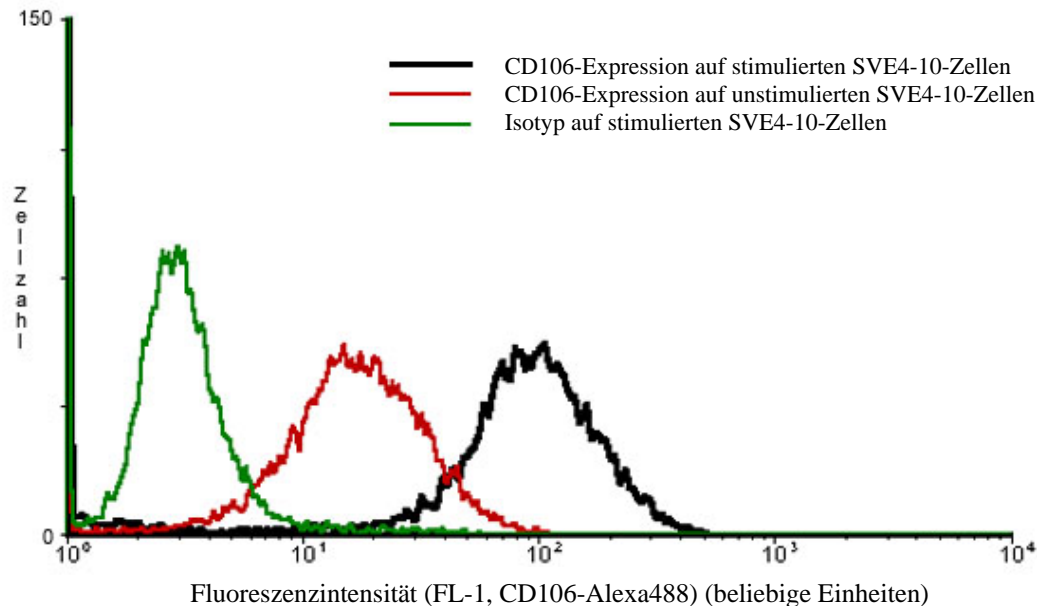
Inkubationszeit (h)	4	12	24	48	72
Unstimulierte Zellen Isotyp	8,3	16,7	6,1	6,7	24,9
Unstimulierte Zellen CD106	13,7	17,4	19,0	24,0	20
Stimulierte Zellen CD106	29,4	46,2	94,7	98,8	31,8
Fluoreszenzintensität stimuliert (CD106)/unstimuliert (CD106)	2,1	2,7	5,0	4,1	1,6



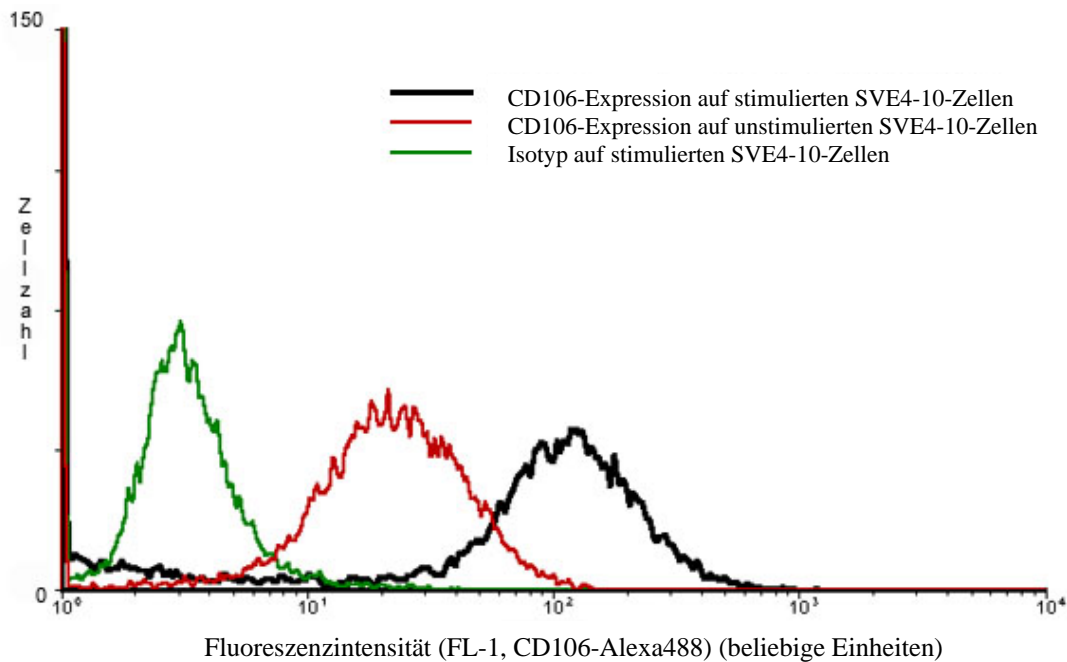
**Abbildung 26: Nachweis der CD106-Expression auf unstimulierten (rot) und stimulierten (50 ng/ml TNF $\alpha$ , 4 h) (schwarz) SVE4-10-Zellen anhand der FACS-Analyse. Ein Antikörper des gleichen Isotyps (grün) wurde mitgeführt. Die primären Antikörper wurden mit einem sekundären fluoreszierenden Antikörper (Alexa488) markiert. Es wurde mit den Wellenlängen  $\lambda_{\text{Absorption}} = 486\text{-}505\text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} = 504\text{-}541\text{ nm}$  gearbeitet. Die Fluoreszenzintensität wurde logarithmisch aufgetragen, die Zellzahl linear.**



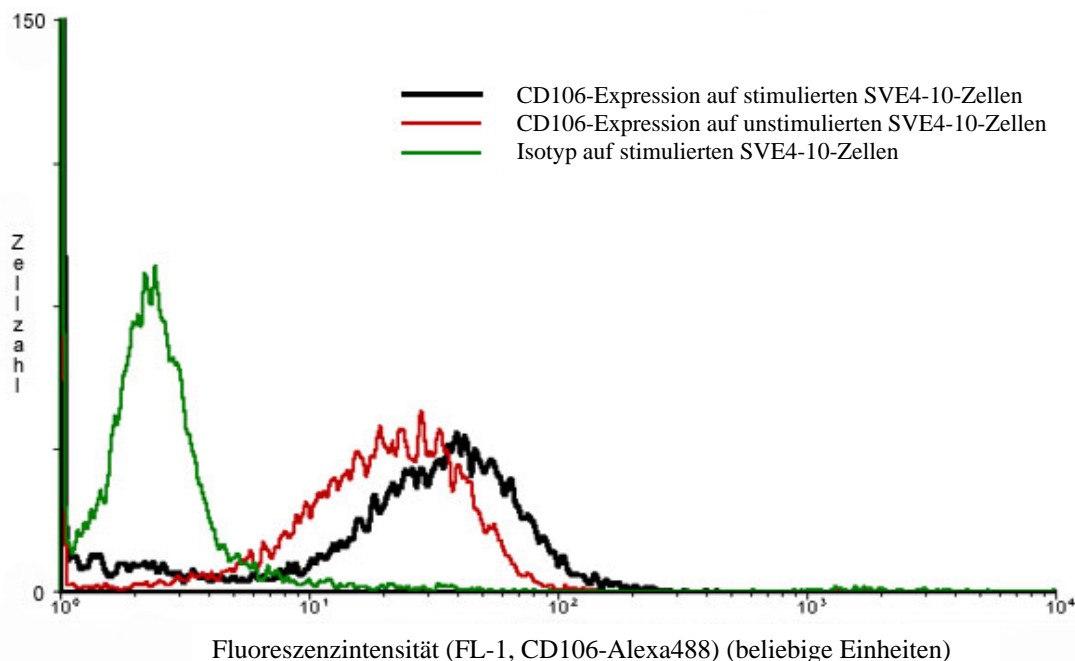
**Abbildung 27:** Nachweis der CD106-Expression auf unstimulierten (rot) und stimulierten (50 ng/ml TNF $\alpha$ , 12 h) (schwarz) SVE4-10-Zellen anhand der FACS-Analyse. Ein Antikörper des gleichen Isotyps (grün) wurde mitgeführt. Die primären Antikörper wurden mit einem sekundären fluoreszierenden Antikörper (Alexa488) markiert. Es wurde mit den Wellenlängen  $\lambda_{\text{Absorption}} = 486\text{-}505$  nm und  $\lambda_{\text{Emission}} = 504\text{-}541$  nm gearbeitet. Die Fluoreszenzintensität wurde logarithmisch aufgetragen, die Zellzahl linear.



**Abbildung 28:** Nachweis der CD106-Expression auf unstimulierten (rot) und stimulierten (50 ng/ml TNF $\alpha$ , 24 h) (schwarz) SVE4-10-Zellen anhand der FACS-Analyse. Ein Antikörper des gleichen Isotyps (grün) wurde mitgeführt. Die primären Antikörper wurden mit einem sekundären fluoreszierenden Antikörper (Alexa488) markiert. Es wurde mit den Wellenlängen  $\lambda_{\text{Absorption}} = 486\text{-}505$  nm und  $\lambda_{\text{Emission}} = 504\text{-}541$  nm gearbeitet. Die Fluoreszenzintensität wurde logarithmisch aufgetragen, die Zellzahl linear.



**Abbildung 29:** Nachweis der CD106-Expression auf unstimulierten (rot) und stimulierten (50 ng/ml TNF $\alpha$ , 48 h) (schwarz) SVE4-10-Zellen anhand der FACS-Analyse. Ein Antikörper des gleichen Isotyps (grün) wurde mitgeführt. Die primären Antikörper wurden mit einem sekundären fluoreszierenden Antikörper (Alexa488) markiert. Es wurde mit den Wellenlängen  $\lambda_{\text{Absorption}} = 486\text{-}505$  nm und  $\lambda_{\text{Emission}} = 504\text{-}541$  nm gearbeitet. Die Fluoreszenzintensität wurde logarithmisch aufgetragen, die Zellzahl linear.



**Abbildung 30:** Nachweis der CD106-Expression auf unstimulierten (rot) und stimulierten (50 ng/ml TNF $\alpha$ , 72 h) (schwarz) SVE4-10-Zellen anhand der FACS-Analyse. Ein Antikörper des gleichen Isotyps (grün) wurde mitgeführt. Die primären Antikörper wurden mit einem sekundären fluoreszierenden Antikörper (Alexa488) markiert. Es wurde mit den Wellenlängen  $\lambda_{\text{Absorption}} = 486\text{-}505$  nm und  $\lambda_{\text{Emission}} = 504\text{-}541$  nm gearbeitet. Die Fluoreszenzintensität wurde logarithmisch aufgetragen, die Zellzahl linear.

### Spezifität der Fluoreszenzintensitäten der CD106-Markierung

Die zur *Spezifitätskontrolle* der CD106-Markierung angefertigten Kontrollen mit einem Antikörper des gleichen Isotyps auf stimulierten und unstimulierten SVE4-10-Zellen erbrachten nahezu identische Ergebnisse. In allen Messungen überlappten die Kurvenverläufe der beiden Kontrollansätze fast vollständig und wiesen stets Fluoreszenzintensitätsmittelwerte zwischen 3 und 25 beliebigen Einheiten auf (Tabelle 7). Die Kurvenverläufe zeigten keinen deutlichen Unterschied zwischen der unspezifischen Antikörperbindung auf stimulierten Zellen und auf unstimulierten Zellen. Aus diesem Grund erfolgte in den Diagrammen nur die Darstellung der Kontrolle des Antikörpers des gleichen Isotyps auf stimulierten Zellen. Diese Histogramme überlagerten zu keiner Inkubationszeit die Histogramme der CD106-Markierung auf stimulierten und unstimulierten Zellen. Somit waren die dargestellten CD106-Markierungen auf unstimulierten und stimulierten Zellen spezifisch.

## **5.4 Ergebnisse der fluorometrischen Untersuchungen der beiden unabhängigen Methoden**

In den immunfluorometrischen Ergebnissen im ELISA-Reader und in der FACS-Analyse zeigte sich *CD106 (VCAM-1)* aus der Gruppe der drei untersuchten Oberflächenproteine (CD106, CD105 und CD31) als am stärksten stimuliert. Erste Tendenzen der vermehrten CD106-Expression (5 ng/ml TNF $\alpha$ ) wurden in den Messungen im ELISA-Reader sichtbar. In der verifizierenden Methode der FACS-Analyse wurde außerdem eine deutliche Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit in der Dynamik der Expression des CD106-Rezeptors – sowohl nach Stimulation mit 5 ng/ml als auch mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  – festgestellt.

## **5.5 Zytotoxische Wirkung von TNF $\alpha$**

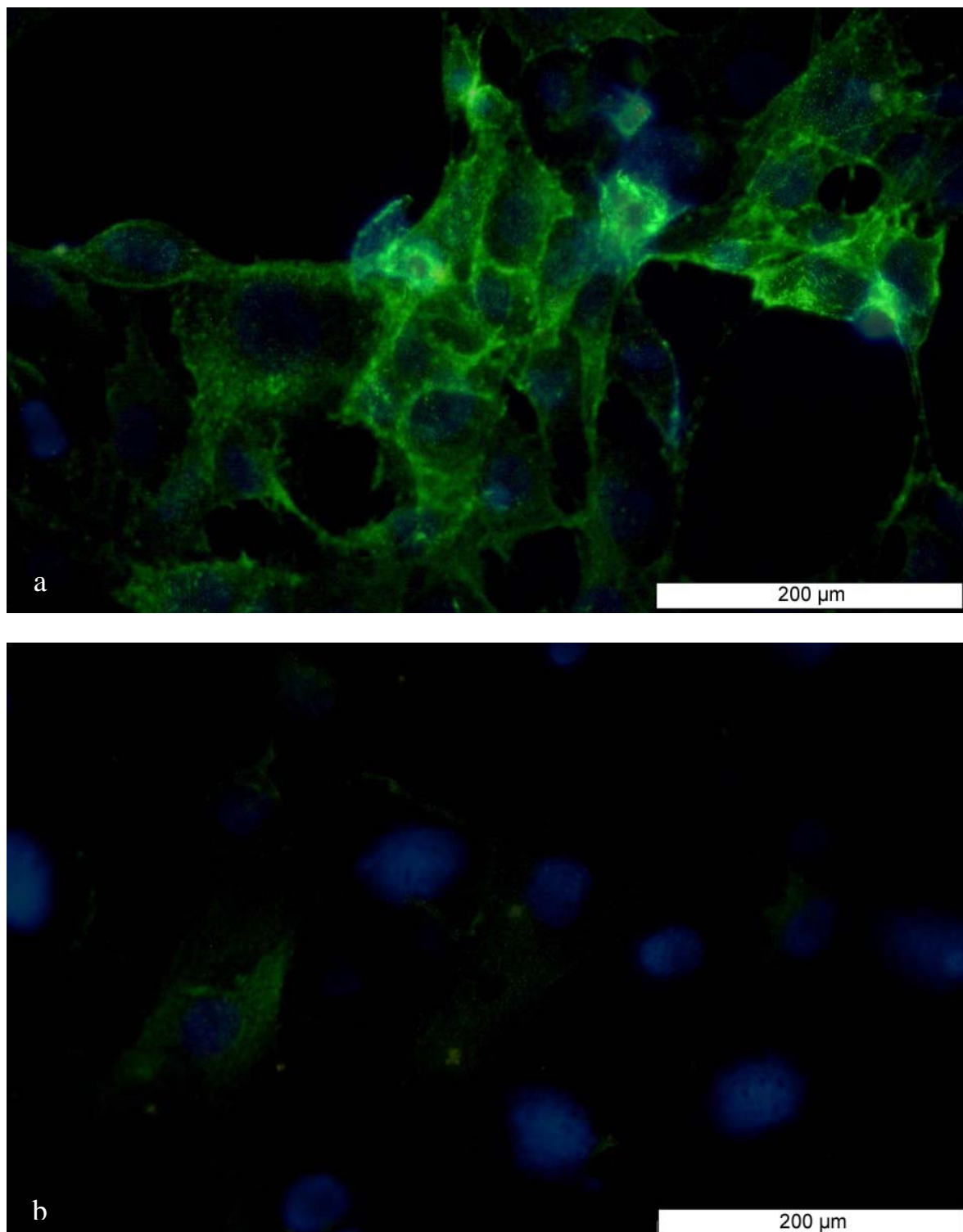
In den Stimulationsuntersuchungen zeigte sich die zytotoxische Wirkung von TNF $\alpha$ . Dies wurde besonders mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  nach 48 beziehungsweise 72 h in den Untersuchungen am ELISA-Reader deutlich (Abschnitt 5.2.1.3). Auch in den stimulierten Zellpopulationen zur anschließenden Analyse im Flow-Cytometer nahm der Anteil toter Zellen im Überstand bei Stimulation mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  nach 48 beziehungsweise 72 h zu.



### **5.6 Ergebnisse der Immunhistochemischen Darstellung der Expression von CD106 auf SVE4-10-Zellen nach Stimulation mit TNF $\alpha$**

Die immunhistochemische Fluoreszenzdarstellung des CD106-Rezeptors auf stimulierten SVE4-10-Zellen (50 ng/ml TNF $\alpha$  über 24 h) zeigte in der 500fachen Vergrößerung eine regelmäßige Verteilung des Rezeptors auf der Zelloberfläche (Abbildung 32a). Im Vergleich mit markierten, unstimulierten Zellen (Abbildung 31b) ließ sich eine deutlich vermehrte Fluoreszenzintensität auf stimulierten Zellen feststellen.

Die Kontrolle auf stimulierten Zellen mit reinem Alexa488 ohne Zugabe des primären Antikörpers zeigte keine Fluoreszenzen ( $\lambda$  = 470-490 nm, Alexa488). Vergleichbare Beobachtungen wurden nach der Markierung mit einem Antikörper des gleichen Isotyps (ohne den spezifisch bindenden Antikörperanteil) gemacht. Zur Veranschaulichung der Zellmorphologie wurde eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt. Diese wurde in allen vier Ansätzen gleichmäßig sichtbar.



**Abbildung 31:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung markierter CD106-Rezeptoren auf a: stimulierten (50 ng/ml TNF $\alpha$ , 24 h) SVE4-10-Zellen und b: unstimulierten SVE4-10-Zellen. Der Oberflächenrezeptor CD106 wurde indirekt mit Alexa488 markiert (grün,  $\lambda = 470-490$  nm). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau,  $\lambda = 330-385$  nm). Messbalken 200  $\mu$ m.

### 5.7 Ergebnisse der spezifischen Bindung einer Modellsonde (magnetische Nanopartikel) an den CD106-Rezeptor stimulierter SVE4-10-Zellen

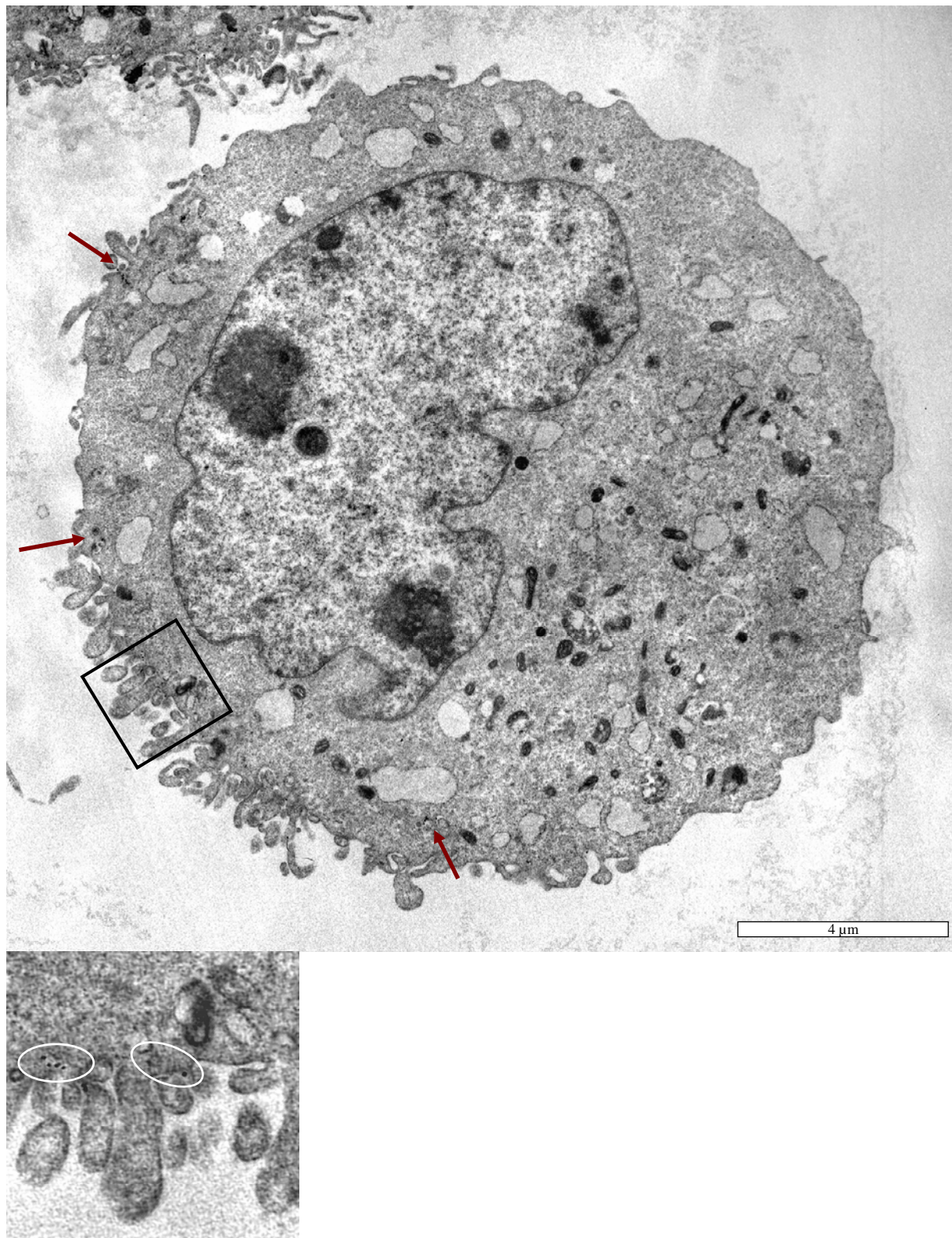
Die Zellansätze mit spezifisch gebundenen und unspezifisch angelagerten magnetischen Nanopartikeln wiesen bereits während der Zellpräparation Unterschiede auf. So wurde während der Zellseparation im Magnetfeld in der Zellsuspension mit *spezifisch gebundenen* Nanopartikeln während des Spülganges ein Zellverlust von 34% festgestellt. Der Zellverlust in der Zellsuspension mit *unspezifisch angelagerten* Nanopartikeln hingegen betrug 53% (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Zellverluste in Suspensionen spezifisch (Anti-CD106-Antikörper-vermittelt) bzw. unspezifisch (ohne Antikörper) mit Nanopartikeln gekoppelter SVE4-10-Zellen nach magnetischer Zellseparation (Trennung der markierten Zellen von den unmarkierten Zellen über eine Säule im magnetischen Feld).**

Antikörperzugabe zu stimulierten SVE4-10-Zellen	Inkubierte Zellzahl	im magnetischen Feld ausgewaschene Zellzahl	Zellverlust (%)
Anti-CD106-Antikörper Nanopartikel	$7 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	<b>34%</b>
Nanopartikel	$7 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$	<b>53%</b>

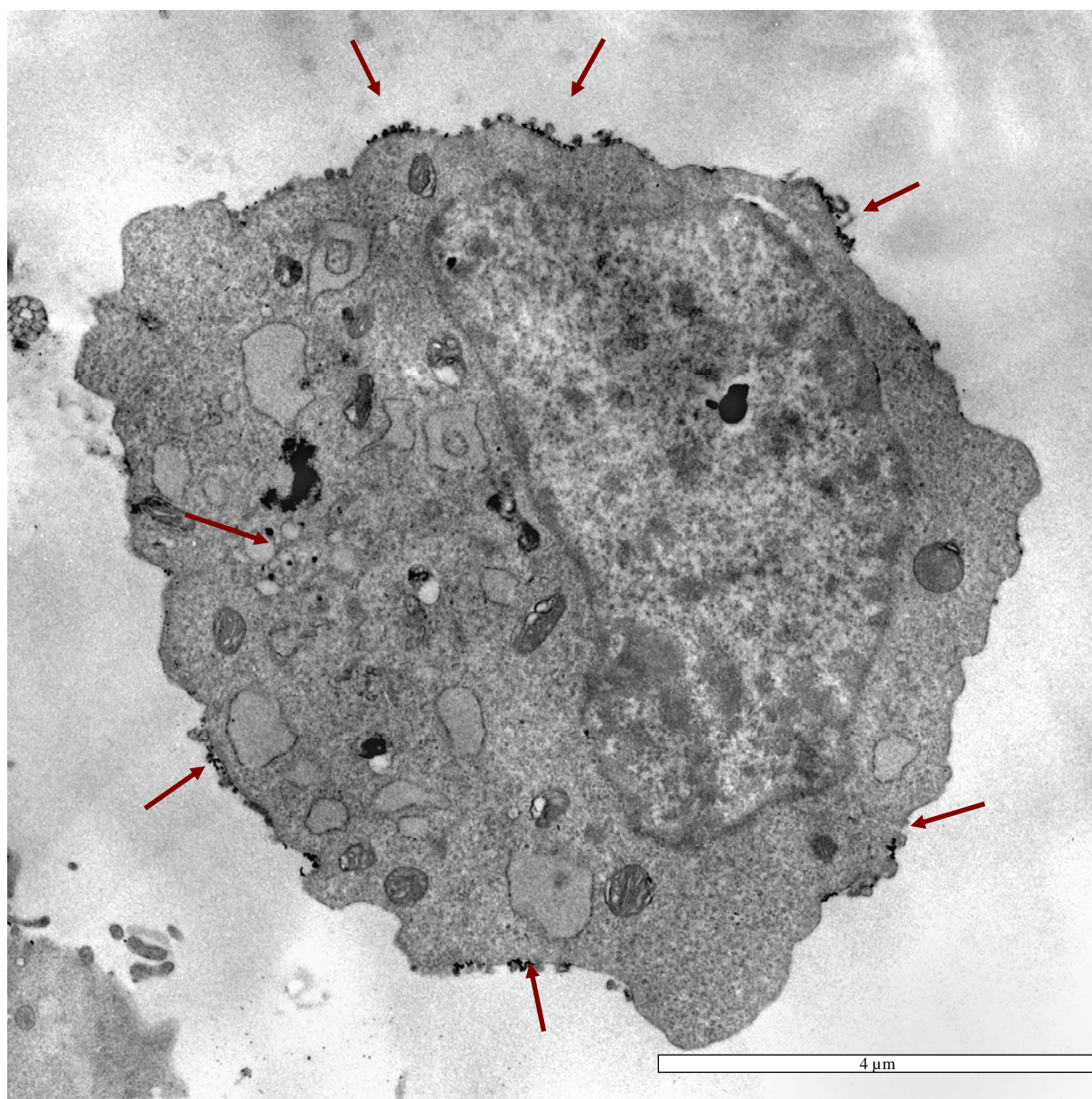
Im Rahmen elektronenmikroskopischer Untersuchungen zur spezifischen Bindung magnetischer Nanopartikel an den CD106-Rezeptor von SVE4-10-Zellen konnte eine spezifische Bindung der Nanopartikel an das Plasmalemm der Zellmembran festgestellt werden.

Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen geht hervor, dass die spezifisch an die Zellmembran gebundenen Nanopartikel partiell internalisiert wurden (Abbildung 32). Dies war auch in verschiedenen Wachstumsphasen der Zellen möglich (Abbildung 33). Der antikörperfreie Kontrollansatz mit Nanopartikeln zeigte nur geringe Anlagerungen vorwiegend agglomerierter Nanopartikel. Diese wurden nicht internalisiert (Abbildung 34).

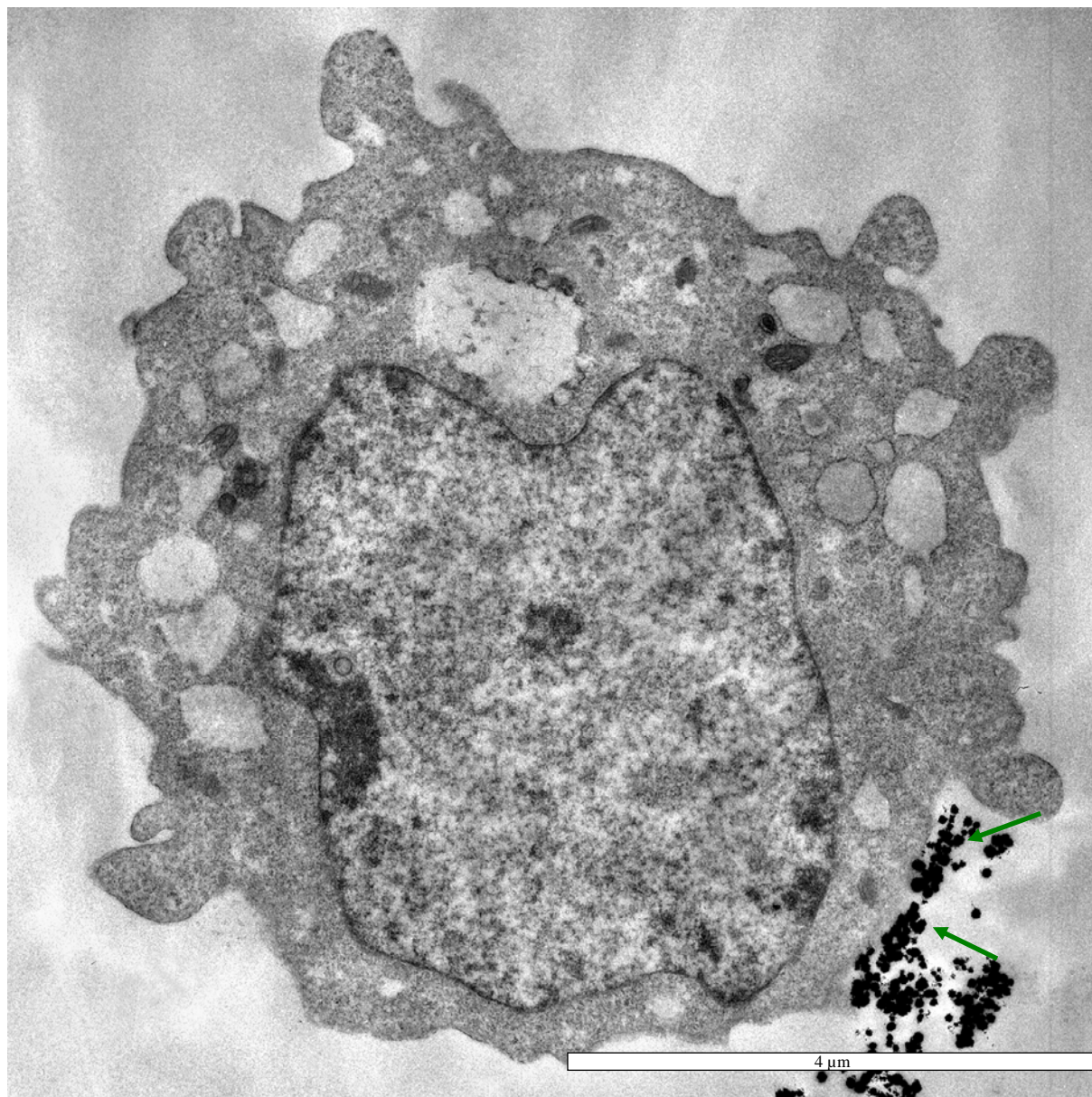


**Abbildung 32:** Elektronenmikroskopische Darstellung einer TNF $\alpha$ -stimulierten (50 ng/ml TNF $\alpha$ , 24 h) SVEC4-10-Zelle mit spezifisch an die Zellmembran gebundenen und teilweise schon internalisierten magnetischen Nanopartikeln (rote Pfeile). Die spezifische Ankopplung erfolgte über einen biotinylierten Antikörper gegen CD106-Rezeptor. Die Streptavidin-gekoppelten Nanopartikel reagierten mit dem Biotin dieses Antikörpers. Das Ergebnis wurde durch einen wiederholten Versuch bestätigt. Messbalken 4  $\mu$ m.





**Abbildung 33:** Elektronenmikroskopische Darstellung einer TNF $\alpha$ -stimulierten (50 ng/ml TNF $\alpha$ , 24 h) SVEC4-10-Zelle mit spezifisch an die Zellmembran gebundenen und teilweise schon internalisierten magnetischen Nanopartikeln (rote Pfeile). Die spezifische Ankopplung erfolgte über einen biotinylierten Antikörper gegen CD106-Rezeptor. Die Streptavidin-gekoppelten Nanopartikel reagierten mit dem Biotin dieses Antikörpers. Das Ergebnis wurde durch einen wiederholten Versuch bestätigt. Messbalken 4  $\mu$ m.



**Abbildung 34:** Elektronenmikroskopische Darstellung einer TNF $\alpha$ -stimulierten (50 ng/ml TNF $\alpha$ , 24 h) SVEC4-10-Zelle mit unspezifisch an die Zellmembran angelagerten, teilweise agglomerierten Nanopartikeln (grüne Pfeile) ohne Internalisierungen. Es wurde kein spezifischer Antikörper zugegeben. Das Ergebnis wurde durch einen wiederholten Versuch bestätigt. Messbalken 4  $\mu$ m.



## 6 Diskussion

In den Untersuchungen zur Expression der drei ausgewählten Oberflächenrezeptoren auf der Endothelzelllinie SVEC4-10 wurde nach TNF $\alpha$ -Stimulation eine signifikant erhöhte Expression von CD106 (VCAM-1) deutlich. Für diese Experimente wurden in Vorversuchen die optimalen Aussaatzellzahlen, Substratbeschichtungen und Waschbedingungen ermittelt.

In den Fluoreszenzmessungen der rezeptormarkierten, stimulierten Zellen entsprachen sich die beobachteten Effekte in den beiden unabhängigen Verfahren in ihren Tendenzen. Im Vergleich der Messungen im ELISA-Reader mit den Ergebnissen der FACS-Analyse war in letzterer eine wesentlich deutlichere Änderung der Rezeptorexpression nach Stimulation der Zellen sichtbar.

Im Anschluss an die Parameteroptimierung der Rezeptorstimulation zeigte sich eine spezifische Ankopplung einer Modellsonde an SVE4-10-Zellen.

### 6.1 Diskussion der Parameteroptimierung zur Rezeptoruntersuchung

#### 6.1.1 Untersuchung der Zellkultur auf Sterilität

Eine Mykoplasmenkontamination der SVE4-10-Zellen wurde anhand eines DAPI-Tests im Vorfeld sowie im Verlauf der Versuchsreihen wiederholt ausgeschlossen. Die Sensitivität des anerkannten Tests [RUSSELL et al. 1975] wurde durch die Fixierung der Zellen erhöht [JAGIELSKI et al. 1976]. Deutliche Zeichen einer Kontamination sind diffus im Cytoplasma verteilte, kleine, fluoreszierende Punkte und eine undeutliche Abgrenzung des Zellkerns gegenüber dem Cytoplasma [LINDL 2000]. Diese Merkmale konnten in der untersuchten Zellkultur nicht beobachtet werden.

Auch in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten keine Hinweise auf eine Kontamination der Zellen mit Bakterien, Pilzen oder Viren festgestellt werden [LINß 2003, persönliche Mitteilung].

Somit wurden Verfälschungen der Ergebnisse durch Kontamination der Zellen mit Mikroorganismen mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen. Die bereits nachgewiesene Beeinflussung der Rezeptorstimulation durch bakterielle Produkte (zum Beispiel Lipopolysaccharide) [SANO et al. 1994] konnte daher ebenfalls weitgehend ausgeschlossen werden.

### ***6.1.2 Ermittlung der optimalen Aussaatzellzahlen für verschiedene Wachstumszeiten***

Die für unterschiedliche Inkubationszeiten ermittelten Aussaatzellzahlen führten zu Rezeptormarkierungen konfluenter Zellpopulationen vor deren Eintritt in die Phase des stationären Wachstums.

Anhand des MTS-Tests (Lebendzellzahlbestimmung) war ein klarer Zuwachs der Zellpopulationen verschiedener Aussaatzellzahlen nach bestimmten Wachstumszeiten (21, 45, 69, 107 h, ohne Stimulans) zu beobachten. Dabei wurde deutlich, dass mit steigender Aussaatzellzahl und zunehmender Wachstumszeit der Zuwachs der Zellpopulationen vorerst gleich bleibend und schließlich vermindert war. Der stetige Zuwachs der Zellpopulation sprach für ein logistisches Wachstumsverhalten [BECKER et al. 1994]. Bei vermindertem Zuwachs der Zellpopulationen sowie bei sinkendem Anteil vitaler Zellen (steigende Aussaatzellzahl, gleich bleibende Inkubationszeit) war von einem Übergang in die Phase des stationären Wachstums auszugehen (beispielsweise  $1 \times 10^4$  Zellen/ Well [0,33 cm<sup>2</sup>], 69 h). Die Zellpopulationen der ausgewählten Aussaatzellzahlen befanden sich zum Ende der festgelegten Wachstumszeiten vor dieser stationären Phase. Aus diesem Grunde konnten Einflüsse auf die Ergebnisse der Hauptexperimente durch Eigenschaften der stationären Phase vermindert werden. Zu diesen Einflüssen zählen die Anreicherung ungünstig beeinflussender Stoffwechselprodukte sowie die Erschöpfung der Nährstoffe und die hohe Zelldichte, welche Ursache des verminderten Zuwachses der Zellpopulation sein können [KLEINIG et al. 1999].

Das Arbeiten mit Zellpopulationen im Wachstumsstadium vor der stationären Wachstumsphase ermöglichte Untersuchungen mit einer hohen Anzahl vitaler Zellen. Die Zellen sollten trotz verschiedener Wachstumszeiten im Stimulationsmedium (kurz: Stimulationszeiten) unter gleichen, günstigen Lebensbedingungen vorliegen. Zum einen sollte ein eventueller Einfluss des Wachstumsstadiums auf die Zellpopulationen und deren Expressionsverhalten zum Zeitpunkt der Markierung in allen Ansätzen vergleichbar sein. Zum anderen wurde dadurch mit annähernd vergleichbaren Zellzahlen zum Zeitpunkt der Markierung gearbeitet. Dies legitimierte die Vergleiche zwischen den Ergebnissen der Fluoreszenzmessungen.

Mit der Festlegung des Wachstumsstadiums zum Zeitpunkt der Markierung konnte das Konfluenzstadium der Zellpopulationen zum Stimulationszeitpunkt mit TNF $\alpha$  nicht mehr



beeinflusst werden. In den Hauptexperimenten wurden die Aussaatzellzahlen entsprechend den Wachstumszeiten gewählt. Aufgrund der Orientierung auf das Wachstumsstadium zum Markierungszeitpunkt wurde somit das Stimulans zu verschiedenen konfluenten Zellpopulationen (verschiedene Wachstumsstadien) zugegeben. Für die längste Inkubationszeit (72 h) lag dabei die geringste Konfluenz der Zellpopulation vor. Hier wurde mit einer Aussaatzellzahl von 3.300 Zellen/cm<sup>2</sup> eine nicht-konfluente Zellpopulation stimuliert. Dass das Konfluenzstadium der Zellen aber bereits die basale Rezeptorexpression beeinflusst, wurde an HUVE-Zellen nachgewiesen. Bei Aussaatzelldichten unter 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup> wurde eine vorübergehend verminderte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 während der ersten drei Tage (72 h) nach der Aussaat festgestellt [VAN DER ZIJPP et al. 2003].

Es ist aber ebenso denkbar, dass durch unterschiedliche Konfluenzzustände zum Zeitpunkt der Stimulation nicht nur die basale Rezeptorexpression (keine Stimulation), sondern auch die Intensität der Rezeptorexpression nach Stimulation beeinflusst wird. Die für den 72-h-Wert festgelegte Zelldichte lag weit unterhalb, die für den 48-h-Wert ermittelte Aussaatzellzahl nahe der von VAN DER ZIJPP et al. an HUVE-Zellen ermittelten Grenze der normalen Rezeptorexpression [VAN DER ZIJPP et al. 2003]. Eine Übertragung dieses, an HUVE-Zellen erstellten Modells auf SVE4-10-Zellen lässt folgende Überlegung zu: Die für die 72stündige Stimulation ausgesäte Zellpopulation befand sich zum Stimulationszeitpunkt in einer Phase der verminderten basalen Rezeptorexpression. Es ist möglich, dass in dieser Phase auch die Stimulierbarkeit der Rezeptorexpression durch TNF $\alpha$  herabgesetzt war und sich aus diesem Grund von der Stimulierbarkeit in konfluenteren Phasen des Zellwachstums deutlich unterschied. Ein solcher Unterschied in der initialen Stimulierbarkeit kann sich auf die Rezeptorexpression nach 72stündiger Stimulation ausgewirkt haben. Dieser in der Festlegung der Aussaatzellzahlen begründete Einflussfaktor wurde daher in die Betrachtungen der weiteren Ergebnisse einbezogen.

Den beobachteten Absorptionswerten lag ein Substratumsatz durch ein zelluläres Enzym (zelleigene Dehydrogenase) zu Grunde. Aufgrund der Zugabe des Substrats im Überschuss arbeitete das Enzym im Sättigungsbereich. Daher waren die Absorptionswerte hauptsächlich von der Enzymmenge (und somit der Zellzahl) abhängig. Ein Einfluss auf die Absorptionswerte durch geringe Schwankungen der Substratmenge sowie durch Substratmangel konnten weitgehend ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Aussaatzellzahl so gewählt wurde, dass zum Zeitpunkt der Rezeptormarkierung eine im Bezug auf die Fluoreszenzmessung optimierte Zelldichte vorlag. Dabei ist die Stimulationsfähigkeit der Zellpopulationen möglicherweise abhängig von der Konfluenz der Zellen zum Zeitpunkt der Stimulation.

### **6.1.3 Variation von Waschpuffer und Wachstumsmatrix zur Optimierung der Zelladhäsion in den Messungen am ELISA-Reader**

Für die Rezeptormarkierung der Zellen und die anschließende Analyse im ELISA-Reader wurden Bedingungen ermittelt, unter denen die Zellen stabil an der Welloberfläche hafteten. Die Ergebnisse wiesen dabei auf ein sehr unterschiedliches Adhäsionsverhalten der SVE4-10-Zellen unter Variation von Waschpuffer und Wachstumsmatrix hin.

Die Auswirkung des Mangels von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen wurde an den mit Phosphatpuffer (PB) gewaschenen Zellen deutlich. Der Puffer PB verursachte bei beiden pH-Werten (pH 7,2 und pH 7,4) ein Ablösen aller Zellen. Die Ionen  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  sind bekanntlich für die Aufrechterhaltung der Osmolarität und des Membranpotentials der Zelle essentiell. Extreme hypoosmolare Bedingungen werden durch einen Mangel dieser Ionen sowie anderer osmotisch wirksamer Substanzen im zellumgebenden Medium hervorgerufen. Sie können durch osmotisch bedingten Wassereinstrom (sowie durch Störung des Zellpotentials) zum raschen Zelltod durch Lyse führen [ALBERTS et al. 2002a]. In diesem Zusammenhang ließ sich anhand der Zusammensetzung der Phosphatpuffer das Ablösen der Zellen von der Matrix durch eine hypoosmotisch bedingte Lyse erklären.

Eine stärkere Adhäsion der mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -haltigem PBS gewaschenen Zellen, auch im Vergleich mit den mit reinem PBS gewaschenen Zellen, fiel in allen *beschichteten Wells* auf. Dieser beobachtete Einfluss zweiwertiger Ionen auf das Adhäsionsverhalten der Zellen bietet folgende Erklärungsansätze: An der Zelladhäsion sind sowohl Proteine beteiligt, die für den Zusammenhalt der Zellen untereinander benötigt werden (Zell-Zell-Adhäsion) als auch Proteine, die das Haften der Zellen an der Matrix (Zell-Matrix-Adhäsion) vermitteln. Die wichtigsten Proteine der Zell-Zell-Adhäsion sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Cadherine [ALBERTS et al. 2002b], während die Zell-Matrix-Adhäsion durch  $\text{Ca}^{2+}$ - oder  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Integrine ausgebildet wird [ALBERTS et al. 2002b]. Der Anteil an  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ - Ionen im

zellumgebenden Medium ist für die Stabilität der Bindung der Cadherine und Integrine und somit der Adhäsion der Zellen – untereinander und an die Matrix – relevant. Die hier beschriebene  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Abhängigkeit der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle erklärt die im Mikroskop beobachtete stärkere Adhäsion der Zellen in allen mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -haltigem PBS gewaschenen, beschichteten Wells.

Dem Zellverhalten auf *unbeschichteten Wells*, in welchen reines PBS eine bessere Zelladhäsion verursachte als PBS mit zweiwertigen Ionen, müssen andere Wechselwirkungen mit der Wachstumsmatrix zu Grunde liegen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten diese nicht weiter untersucht werden.

Der pH-Wert des Puffers wurde als weiterer, adhäsionsbeeinflussender Faktor untersucht. Hier ließ sich für die Puffer PBS ohne oder mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen feststellen, dass die Behandlung mit dem Puffer des höheren pH-Wertes (7,4) jeweils zu einer stärker ausgeprägten Zelladhäsion führte als die mit dem Puffer des niedrigeren pH-Wertes (7,2). Der pH-Wert von 7,4 kam dabei der physiologischen Situation näher. Aussagen, die sich auf Zusammenhänge zwischen dem pH-Wert des umgebenden Mediums und der Zelladhäsion beziehen, konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Es sind jedoch Untersuchungen zu Interaktionen zwischen dem pH-Wert des umgebenden Mediums und dem Wachstumsverhalten der Zelle bekannt [VAN DER SAAG et al. 1981]. An Neuroblastomzellen von Mäusen kam es bei pH-Werten zwischen 8,0 und 6,5 mit zunehmender Ansäuerung des Kulturmediums zur reversiblen Wachstumshemmung [VAN DER SAAG et al. 1981]. Da das Wachstumsverhalten der Zellen und der Zellstoffwechsel eng verknüpft sind, war in diesem Zusammenhang auch ein Einfluss des pH-Wertes auf das Adhäsionsverhalten der Zellen (über den Zellstoffwechsel) nicht auszuschließen. In Anlehnung an diese Ergebnisse war eine Wachstumsbeeinträchtigung der Zellen durch einen pH-Wert von 7,2 im Vergleich zu pH 7,4 möglich, was in Korrelation zur Aktivität des Zellstoffwechsels und somit der Zelladhäsion stehen kann.

Im Vergleich der eingesetzten Waschpuffer ließen sich phasenkontrastmikroskopisch die geringsten Veränderungen der Zellmorphologie und die höchste Zellkonfluenz in allen mit DMEM gewaschenen Zellpopulationen – unabhängig von der Wachstumsmatrix – beobachten. Damit erwies sich DMEM als optimaler Waschpuffer für die SVE4-10-Zellen und wurde für die weiterführenden Untersuchungen ausgewählt.

In den mikroskopischen Beobachtungen zur Untersuchung des Einflusses der Wachstumsmatrix wurde die beste Zelladhäsion auf den Gelatinebeschichtungen ohne und mit Trockenschränkinubation beobachtet. In der an den Waschprozess anschließenden Lebendzellzahlbestimmung zeigten sich Unterschiede im Zellverhalten für den optimalen Waschpuffer DMEM auf den verschiedenen Matrizes: Die Gelatinebeschichtungen ohne und mit Trockenschränkinubation, die Poly-L-Lysin-Beschichtung ohne Trockenschränkinubation sowie die unbeschichteten Wells erwiesen sich als gleichermaßen zelladhäsionsfördernd und nicht signifikant voneinander verschieden. Die Poly-L-Lysin-Beschichtung mit Trockenschränkinubation wies jedoch eine wesentlich geringere Lebendzellzahl auf. Damit wurde deutlich, dass die Wachstumsmatrix das Adhäsionsverhalten der Zellen beeinflusste. Untersuchungen dieser Zusammenhänge für SVE4-10-Zellen sind bisher nicht bekannt. Jedoch finden sich in der Literatur dem entsprechende Studien für andere Zelllinien. So wird für mesenchymale Stammzellen und Ligamentzellen eine bessere Zelladhäsion auf Fibronectin als unter anderem auf Poly-L-Lysin nachgewiesen. Dieser Effekt liegt bei einer dritten Zelllinie (Chondrocyten) nur in abgeschwächter Form vor [TSUCHIYA et al. 2001]. Sowohl die Untersuchungen an SVE4-10-Zellen als auch die Ergebnisse von TSUCHIYA et al. sprechen dafür, dass jede Zelle ihr eigenes Muster an Adhäsionsmolekülen besitzt [TSUCHIYA et al. 2001; ALBERTS et al. 2002a]. Dieses Muster führt zu unterschiedlichen Wechselwirkungen der Zellen mit der extrazellulären Matrix und bedingt, dass das Adhäsionsverhalten der Zellen zelllinienabhängig variiert. Die in der vorliegenden Arbeit als optimal erachtete Wachstumsmatrix (Gelatinebeschichtung mit Trockenschränkinubation) gilt somit für SVE4-10-Zellen.

Die quantitative Lebendzellzahlbestimmung zeigte im MTS-Test nur für die mit dem Waschpuffer DMEM behandelten Zellen relevante Lebendzellzahlen. Das folglich zu erwartende Absterben der Zellen in allen anderen Ansätzen konnte jedoch durch mikroskopische Beobachtungen nicht bestätigt werden. Ursache für diesen scheinbaren Widerspruch könnten Veränderungen des Zellstoffwechsels oder der zelleigenen Dehydrogenase gewesen sein. Um dies im Detail zu klären, sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Insgesamt wurden in den vorliegenden Untersuchungen Abhängigkeiten der Zelladhäsion von der Anwesenheit an  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen, dem pH-Wert, der Osmolarität des Puffers sowie den Wechselwirkungen mit der Matrix beobachtet. So verbesserten die Anwesenheit zweiwertiger Ionen sowie ein höherer pH-Wert (7,4) die Adhäsion der Zellen auf beschichteten Wells. Die beste Zelladhäsion wurde jedoch unter Verwendung des Waschpuffers DMEM festgestellt. Des weiteren erwies sich die Gelatinebeschichtung mit anschließender Trockenschrankinkubation für die Zelllinie SVEC4-10 auf der Basis morphologischer Beurteilungen als geeignete Matrix und wurde als solche durch die Lebendzellzahlbestimmung bestätigt. Das Zelladhäsionsverhalten stand somit unter dem Einfluss verschiedenster Faktoren und war Resultat komplexer Interaktionen, von denen nur eine Auswahl untersucht werden konnte.

Zur Ermittlung des *neuen Werkzeuges* wurde somit für die Untersuchungen am ELISA-Reader die Gelatinebeschichtung mit anschließender Trockenschrankinkubation als Adhäsionsmatrix verwendet sowie DMEM als Waschpuffer.

## **6.2 Diskussion der am ELISA-Reader untersuchten Expression von CD106, CD105 und CD31 auf SVE4-10-Zellen nach Simulation mit $\text{TNF}\alpha$**

Die Untersuchung der Oberflächenrezeptoren im ELISA-Reader ließ nur für den Rezeptor CD106 positiv signifikante Stimulationseffekte erkennen. Diese Beobachtungen beziehen sich ausschließlich auf eine Konzentration von 5 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$ .

Vermutlich lag bei Stimulation mit 0,05 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  eine zu geringe Konzentration an  $\text{TNF}\alpha$  vor, so dass keine Veränderungen der Rezeptorexpression eintraten. Hingegen entsprach die gegenüber unstimulierten Zellen unveränderte Expression von CD106 nach Stimulation mit 50 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  nicht den erwarteten Ergebnissen und sollte im Rahmen der Sensitivität der angewandten Methode betrachtet werden.

Zytotoxische  $\text{TNF}\alpha$ -Wirkungen konnten bei einer Inkubation mit 50 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  über eine Inkubationszeit von 48 beziehungsweise 72 h in Form der Zellablösung von der Wachstumsmatrix beobachtet werden. Die zytotoxischen Effekte werden im weiteren Verlauf der Diskussion separat betrachtet.

Im Allgemeinen wurden im ELISA-Reader diskrete Unterschiede zwischen den Fluoreszenzintensitäten der spezifisch markierten Oberflächenrezeptoren und der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz beobachtet. Die auf unstimulierten SVE4-10-Zellen bekannte Expression von CD106 [AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC) 2002], für welche ein Signal erwartet wurde, konnte nicht nachgewiesen werden. Die geringen statistischen Signifikanzen der im ELISA-Reader ermittelten Fluoreszenzintensitäten standen im Gegensatz zu Untersuchungen im Microwell-Plate-Reader von STEWART et al. [STEWART et al. 1996]. Die Arbeitsgruppe konnte mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz an bovinen Aorta-Endothelzellen nach TNF $\alpha$ -Stimulation für CD31 eindeutig statistisch signifikante Effekte nachweisen [STEWART et al. 1996]. Die geringere Signifikanz der Fluoreszenzintensitäten in der vorliegenden Arbeit und die dabei erhöhte Hintergrundfluoreszenz sollen durch die im Folgenden angesprochenen methodischen Einflüsse überprüft werden.

Mediumeinflüsse als Ursache einer gestörten Antikörperbindung an die Rezeptoren waren nach Aussage des Herstellers eher unwahrscheinlich [HIRSCH 2004, persönliche Mitteilung]. Diese Angabe wurde durch Untersuchungen ergänzt, in welchen Kulturmedium zum Ansatz der Antikörperverschüttung beziehungsweise zum Waschen von Zellen erfolgreich eingesetzt wurde [ST LOUIS et al. 1993; KANG et al. 2002; VAN DER ZIJP et al. 2003].

Internalisierungen der Antikörper nach deren Bindung an die Rezeptoren waren in den Experimenten der vorliegenden Arbeit in ihrer Bedeutung als gering einzustufen, jedoch nicht auszuschließen. Während der Inkubationszeiten wurden die Zellen stets auf Eis gehalten, was Internalisierungsvorgänge weitgehend ausschließt [RADBRUCH 1992]. Jedoch erfolgte während des Waschpufferwechsels beziehungsweise der mikroskopischen Kontrollen keine Kühlung, weshalb Internalisierungen der primären Antikörper während dieser Arbeitsschritte grundsätzlich möglich waren. Eine Internalisierung der primären Antikörper vermindert die Bindungsfähigkeit des sekundären Antikörpers. Dies würde, ebenso wie der Abbau gebundener Antikörper, zur Verminderung der fluorometrisch sichtbaren spezifischen Markierung beitragen. Aufgrund der nur kurzzeitigen Unterbrechungen der Kühlung der Zellen wurde der Einfluss der Internalisierung auf die Ergebnisse als gering eingeschätzt.

Eine mögliche Einschränkung der Genauigkeit der Messungen ließ sich in der notwendigen exakten Einstellung der Messebene zur Fluoreszenzdetektion im ELISA-Reader suchen. Diese Messebene war nur im Millimeterbereich verstellbar. Um die fluoreszierenden Partikel

nicht auf den schmalen Bereich des Zellteppichs zu beschränken, wurden die Zellen nach abgeschlossener Markierung mit SDS solubilisiert. Es erfolgte somit eine Fluoreszenzmessung in Suspension. Diese Volumenvergrößerung führte zu einer Verbreiterung der Messebene auf 0,76 mm. Doch der Messebenenverbreiterung wirkten Adhäsionskräfte zwischen Suspension und Wellwand entgegen. Dies kann mit dazu beigetragen haben, dass trotz der Verbreiterung der fluoreszierenden Ebene bereits kleine Veränderungen der Plattenposition im Gerät Schwankungen der Messwerte zur Folge hatten. Dem sollte durch sechsfachen Probenansatz pro Messung sowie mindestens einmaliger Wiederholung der Experimente Rechnung getragen werden. Grundsätzlich ist es dennoch möglich, dass die hier beschriebenen Zusammenhänge zur geringen statistischen Signifikanz der Ergebnisse beigetragen haben.

Die Solubilisierung markierter Zellen mit SDS (0,1%) ist eine bekannte Methode und führte in anderen Experimenten zur erfolgreichen Detektion von markierten Proteinen [STEWART et al. 1996; KANG et al. 2002]. Auch eine Beeinträchtigung des Fluorochroms Alexa488 durch die Solubilisierung mit SDS konnte ausgeschlossen werden [SCHULZ 2004, persönliche Mitteilung]. Allerdings könnte die mit der Solubilisierung verbundene Verdünnung der Konzentration des Alexa-Farbstoffes eine Abschwächung des Fluoreszenzsignals bewirkt haben.

Als weiterer Einflussfaktor auf die Signifikanz der Stimulationseffekte ist die erhöhte Autofluoreszenz im Ansatz zu betrachten. Eine vermehrte Autofluoreszenz erhöht die Hintergrundfluoreszenz, wodurch die Detektion der gesuchten Fluoreszenzsignale erschwert wird. Der Kontrollansatz, welcher reines Solubilisierungsmedium auf Gelatinebeschichtung enthielt, wies Fluoreszenzintensitätswerte ähnlich den stimulierten/ unstimulierten Zellansätzen auf. Zum einen war dazu eine erhöhte Eigenfluoreszenz des Mediums in Erwägung zu ziehen. Diese sollte zwar durch den Einsatz von *phenolrotfreiem* DMEM reduziert sein, war jedoch nicht vollständig auszuschließen. Eine wesentliche Beeinflussung der Autofluoreszenz des Mediums durch den Zusatz von SDS (0,1%) war dabei nicht zu erwarten. Zum anderen war ein Einfluss der Autofluoreszenz der Gelatinebeschichtung auf die Fluoreszenzergebnisse möglich, wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht explizit untersucht.

Es ist zu vermuten, dass die hohe Hintergrundfluoreszenz durch die Autofluoreszenz sowohl des Mediums als auch der Wachstumsmatrix mit verursacht wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz des Einsatzes einer durchaus üblichen Methode der Fluoreszenzbestimmung (Fluoreszenzmessung im ELISA-Reader) in den vorliegenden Messungen am ELISA-Reader nur Tendenzen der vermehrten Expression von Antikörpern nachgewiesen werden konnten. Genauere Aussagen sind durch eine verbesserte Methode erreichbar, für welche eine konkrete Kenntnis der Interaktionen der einzelnen Parameter notwendig ist. Damit erwies sich diese Methode als äußerst komplex für die Entwicklung des Zellmodells.

In der zeitabhängigen Betrachtung der CD106-Expression nach Stimulation mit 5 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  wurde eine erste, gering vermehrte Expression gegenüber unstimulierten Zellen nach 12 h deutlich. Diese stand im Gegensatz zu den Ergebnissen der Expressionsuntersuchungen von ICAM-1 an  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten (5 ng/ml) HUVE-Zellen. Hier wurde ein erster, deutlicher Anstieg bereits nach 6 h ermittelt [SANO et al. 1994]. Mögliche Gründe für diese zeitlichen Unterschiede der Regulation waren unter anderem in den Regulationsmechanismen der Proteinexpression zu suchen.

Nach 24stündiger Stimulation (5 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$ ) von SVE4-10-Zellen konnte kein Unterschied in der CD106-Expression auf unstimulierten und stimulierten Zellen festgestellt werden. Das Expressionsmaximum der Expression von CD106 wurde jedoch nach 48stündiger Stimulation (5 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$ ) beobachtet. Somit verlief die CD106-Expression zweiphasig. Auch dies stand im Gegensatz zu Untersuchungen des ICAM-1-Rezeptors an HUVE-Zellen [SANO et al. 1994]. Sie zeigten nach angestiegener ICAM-1-Expression unter  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation eine Plateaubildung der Expression auf. Dieser typische Verlauf war auch für CD106 auf SVE4-10-Zellen erwartet worden, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Ursache dieses Unterschieds konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht geklärt werden und bleibt weiteren Untersuchungen überlassen.

Die Spezifität der CD106-Expression auf stimulierten Zellen wurde belegt durch den Vergleich mit einem unspezifischen Kontrollantikörper des gleichen Isotyps ( $\text{IgG}_1$ ) auf stimulierten Zellen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen für CD106 war die gemessene Fluoreszenzintensität dieses Antikörpers unabhängig von der  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation. Eine Spezifität der CD106-Expression ließ sich nur für die Ergebnisse nach 12 und 48stündiger Stimulation mit 5 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  feststellen. Der mangelnde signifikante Unterschied der



Fluoreszenzintensitäten des Kontrollantikörpers des gleichen Isotyps und der CD106-spezifischen Bindung auf stimulierten Zellen nach 4, 24 beziehungsweise 72 h sprach nicht nur für eine ausbleibende vermehrte Expression von CD106. Vielmehr wurde damit deutlich, dass nach diesen Inkubationszeiten kein CD106 auf der Zelloberfläche markiert werden konnte. Dies steht im Gegensatz zu dem Wissen um die generelle Expression von CD106 auf unstimulierten SVE4-10-Zellen und seiner Stimulierbarkeit durch  $\text{TNF}\alpha$  [SASAKI et al. 2003]. Die Ursachen dieser Differenzen sind unklar und müssten in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Die Fluoreszenzwerte dieses Kontrollantikörpers des gleichen Isotyps waren auch aussagekräftig für die beiden anderen primären Antikörper (CD105, CD31), da unter den Bedingungen der vorliegenden Messung eine Unterteilung der Kontrollantikörper in die Subgruppen  $\text{IgG}_1$  und  $\text{IgG}_2$  irrelevant war [NOETZEL 2003, persönliche Mitteilung].

CD105 war der zweite, in dieser Arbeit an SVE4-10-Zellen untersuchte Rezeptor. Im Gegensatz zu CD106 zeigte CD105 zu keiner Stimulationskonzentration oder -zeit einen Stimulationseffekt. Dementsprechend ließ sich schlussfolgern, dass  $\text{TNF}\alpha$  im Rahmen der untersuchten Stimulationsparameter keinen Einfluss auf die Expression von CD105 auf SVE4-10-Zellen ausübte.

Der beobachtete Unterschied der Expression von CD31 nach 24stündiger Stimulation mit 50 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  war nicht spezifisch. Das ergab der Vergleich mit der Fluoreszenzintensität des Kontrollantikörpers des gleichen Isotyps. Somit konnte für die Expression des CD31-Rezeptors unter  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation zu keiner Inkubationszeit ein positiver oder negativer Effekt mit der angewandten Methode nachgewiesen werden. Aufgrund der mangelnden Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten der CD31-Markierung (stimuliert und unstimuliert) zur Fluoreszenzintensität des Kontrollantikörpers des gleichen Isotyps war davon auszugehen, dass CD31 auch auf unstimulierten Zellen nicht exprimiert wurde.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen an SVE4-10-Zellen wurde CD31 auf HUVE-Zellen exprimiert. Jedoch veränderte sich diese Expression unter Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  (10 ng/ml, 1 h) nicht [YABKOWITZ et al. 1999]. Dieser Unterschied wies im Zusammenhang mit dem beschriebenen Vorkommen von CD31 darauf hin, dass Primärkulturen (HUVE-Zellen) der In-vivo-Situation näher stehen als die etablierte Zelllinie SVEC4-10.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass CD106 als Rezeptor eines Zellmodells zur Entwicklung von Sonden zur molekularen Diagnostik und Therapie einen möglichen Ansatz bietet. Daher war CD106 in der vorliegenden Arbeit Gegenstand weiterer Untersuchungen.

### **6.3 Diskussion der im Flow-Cytometer untersuchten TNF $\alpha$ -stimulierten CD106-Expression auf SVE4-10-Zellen**

Allgemein zeigte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen im ELISA-Reader in den flowcytometrischen Experimenten eine sehr deutlich vermehrte CD106-Expression nach TNF $\alpha$ -Stimulation. Diese wurde sowohl für 5 ng/ml als auch für 50 ng/ml TNF $\alpha$  ermittelt. Die CD106-Expression nach Stimulation mit 0,05 ng/ml TNF $\alpha$  wurde nicht untersucht.

Zur Rezeptorexpressionsanalyse im Flow-Cytometer erfolgte die Antikörperbindung an die Zellen in Suspension. Dazu wurden die stimulierten Zellen mit Trypsin/ EDTA abgelöst. Die enzymatische Zellablösung wurde im Hinblick auf Veränderungen an CD106-Rezeptoren als unbedenklich eingestuft. Diese zur Immunglobulin-Superfamilie gehörenden Moleküle sind durch zahlreiche Glykosylierungen gut vor proteolytischem Abbau geschützt [WAGENER 1999].

Trotz des Markierens der Zellen bei Raumtemperatur waren die Unterschiede der Rezeptorexpression zwischen den verschiedenen Stimulationszeiten deutlich zu erkennen. Sollte diese Arbeitstemperatur Internalisierungsprozesse der Zellen begünstigt haben, ist der Effekt daher als gering einzuschätzen und systematisch in die Untersuchungen eingegangen.

Vergleichende Betrachtungen der zeitabhängigen Rezeptorexpression (4 h, 12 h) zeigten, dass mit zunehmender TNF $\alpha$ -Konzentration (5 ng/ml, 50 ng/ml) eine schnellere und intensivere CD106-Rezeptorexpression erreicht wurde. Diese Beobachtungen der Abhängigkeit des initialen Anstiegs sprachen dafür, dass die *initiale TNF $\alpha$ -Konzentration* einen wesentlichen Einfluss auf die Veränderung der Rezeptorexpression hatte. Dieser Gedanke wurde auch durch die Vermutung unterstützt, dass TNF $\alpha$  in vitro abgebaut wurde und somit nicht in einer konstant bleibenden Konzentration über die gesamte Inkubationszeit vorhanden war. Ausgangspunkt dieser Vermutung ist das Wissen um einen sehr schnellen TNF $\alpha$ -Abbau in vivo. Im gesunden menschlichen Körper ist TNF $\alpha$  im Konzentrationsbereich von wenigen

Pikogramm/Milliliter nachweisbar, wird kontinuierlich sezerniert [TESAR et al. 2002] und innerhalb weniger Minuten abgebaut [DPC BIERMANN 2003]. Da die Mechanismen des Abbaus bisher ungeklärt sind, waren diese in vitro nicht auszuschließen. Würden sie auftreten, so wäre die initiale TNF $\alpha$ -Stimulation der Zellen für das Expressionsverhalten zu allen Inkubationszeiten bedeutsam.

Bei Betrachtung der Optima der CD106-Expression fiel nach 24 h (5 und 50 ng/ml TNF $\alpha$ ) ein Expressionsmaximum dieses Proteins auf. Ein Vergleich mit anderen Untersuchungen zur Proteinstimulation durch TNF $\alpha$  machte deutlich, wie sehr diese zeitabhängigen Effekte der Proteinexpression von der untersuchten Zelllinie und dem untersuchten Protein abhängig sind. Beispielsweise wurde an Knochenmarkstromazellen nach 2 h (50 ng/ml TNF $\alpha$ ) ein Expressionsmaximum für CD106 festgestellt [HIDESHIMA et al. 2001]. Damit wurde das Expressionsmaximum nach wesentlich kürzerer Stimulationszeit erreicht, was Ergebnis anderer Signalmechanismen sein kann. In Sertolizellen von Schweinen wurde erst nach 48 h (10 ng/ml TNF $\alpha$ ) ein Maximum der TNF $\alpha$ -Wirkung in Bezug auf die Expression eines Proteins (Laktatdehydrogenase A) nachgewiesen [BOUSSOUAR et al. 1999]. An der gleichen Zelllinie wurde nach 48 h (20 ng/ml TNF $\alpha$ ) der maximale Effekt von TNF $\alpha$  auch auf ein zweites Protein (Glutathion-S-Transferase) festgestellt [BENBRAHIM-TALLAA et al. 2002]. Im Vergleich der genannten Ergebnisse zeigt sich, dass das Maximum der Proteinexpression von CD106 auf TNF $\alpha$ -stimulierten SVE4-10-Zellen zwischen den zeitlichen Maxima der anderen betrachteten Proteine lag. Dies kann zum einen auf verschiedene Expressionsmechanismen der unterschiedlichen Proteine zurückgeführt werden. Zum anderen kann dies aber auch ein Hinweis sein, dass SVE4-10-Zellen weder hoch sensibel noch stark verzögert auf die Stimulation mit TNF $\alpha$  reagieren.

Der zeitliche Verlauf nach Stimulation zeigte ein eindeutiges Maximum der CD106-Expression nach 24 h (5 ng/ml TNF $\alpha$ ). Für die Stimulation mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  waren hingegen die Fluoreszenzintensitäten nach 24 h und 48 h maximal ausgeprägt. Somit ließ sich für die Stimulation mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  kein eindeutiges zeitliches Maximum bestimmen. Die Effekte der dazwischen liegenden Zeiten wurden nicht untersucht. Es könnte zum einen ein zwischen 24 h und 48 h liegendes, höheres Expressionsmaximum, zum anderen auch eine Plateaubildung über diesem Zeitverlauf zu Grunde liegen.

Eine Plateaubildung ist prinzipiell möglich, da sie nach  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation für Rezeptoren (zum Beispiel ICAM-1) an humanen Endothelzellen bereits nachgewiesen wurde [POBER et al. 1987]. Für die Entwicklung eines Plateaus sind dabei verschiedene Ursachen möglich. Zum einen kann eine konstant erhöhte Rezeptoranwesenheit an der Zelloberfläche durch Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen gesteigerter Rezeptorexpression und gesteigertem Rezeptorabbau vorliegen. Zum anderen ist die Plateaubildung durch steigende Sekretion des Rezeptors bei weiterhin steigender Rezeptorexpression möglich. Auch hierbei handelt es sich im Falle einer Plateaubildung um die Einstellung eines Gleichgewichts. An HDME-Zellen wurde dazu beschrieben, dass sie ICAM-1-Rezeptoren aus der Membran freisetzen und in das umgebende Medium abgeben können [SANO et al. 1994]. Dieser Prozess sowie eine mögliche Gleichgewichtseinstellung müsste für CD106 an der SVE4-10-Zelllinie untersucht werden und kann bei Bestätigung einen weiteren Ansatz zur Erklärung einer Plateaubildung geben.

Da es sich in der vorliegenden Arbeit um stimulierte Zellen handelte, deuten sowohl ein zwischenzeitliches Expressionsmaximum als auch eine Plateaubildung unter bestimmten Bedingungen (keine Rezeptorsekretion) auf eine nachlassende Wirkung von  $\text{TNF}\alpha$  im Verlauf dieser Zeitspanne hin.

Nach längeren Inkubationszeiten mit  $\text{TNF}\alpha$  kam es zur Annäherung der Expression von CD106 an den unstimulierten Zustand. Während dieser Effekt bei einer Konzentration von 5 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  bereits nach 48 h zu beobachten war, trat er bei einer Stimulationskonzentration von 50 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  erst nach 72 h auf. Es ist naheliegend, dass die Effekte auf der nachlassenden Wirkung des  $\text{TNF}\alpha$  beruhten und konzentrationsabhängig waren. Dennoch waren Effekte der Sekretion möglich. So führte die bereits beschriebene Sekretion des ICAM-1-Rezeptors an HDME-Zellen nach 72 h zu dessen verminderter Anwesenheit auf der Zelloberfläche bei weiterhin steigender Serumkonzentration des Rezeptors [SANO et al. 1994]. Denkbar sind daher auch ähnliche Effekte als Ursache der verminderten Anwesenheit von CD106 auf der Zelloberfläche der SVE4-10-Zellen nach 72 h.

Außerdem ist es möglich, dass das Wachstumsstadium der Zellpopulationen zum Zeitpunkt der Stimulation die Stimulierbarkeit beeinflusste. Diese könnte die deutlich geringere CD106-Expression nach 72stündiger Inkubation mit verursacht haben (siehe 6.1.2).

Die wahrscheinlichste Ursache für die nur gering erhöhte CD106-Expression nach 72stündiger Inkubation ist jedoch das Nachlassen der  $\text{TNF}\alpha$ -Wirkung.

Unter definierten Bedingungen (5 beziehungsweise 50 ng/ml TNF $\alpha$ ; 24 h) wurde in der vorliegenden Arbeit eine auf 220% (Faktor 2,2) beziehungsweise 500% (Faktor 5) erhöhte Expression des CD106-Rezeptors auf stimulierten Zellen gegenüber unstimulierten Zellen festgestellt. Diese deutlichen Unterschiede der CD106-Expression auf TNF $\alpha$ -stimulierten Zellen (50 ng/ml, 24 h) gegenüber unstimulierten Zellen konnten auch in der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Im Vergleich dazu wiesen SASAKI et al. nach TNF $\alpha$ -Stimulation (20 ng/ml, 24 h) von SVE4-10-Zellen eine auf 160% (Faktor 1,6) vermehrte Expression von CD106 gegenüber unstimulierten Zellen nach [SASAKI et al. 2003]. Dieser, durch 20 ng/ml TNF $\alpha$  verursachte Effekt, war geringer als der in der vorliegenden Arbeit nach Stimulation mit der geringeren Konzentration von 5 ng/ml TNF $\alpha$  beobachtete Effekt. Dies stand jedoch nicht im Widerspruch zu dem vermuteten Zusammenhang zwischen Konzentration und vermehrter Expression. Die Differenzen ergaben sich aufgrund von Ergebnissen, welche in unterschiedlichen Arbeitsgruppen mit verschiedenen Detektionsmethoden nachgewiesen wurden. Im Nachweis der positiven Stimulierbarkeit des CD106-Rezeptors stimmten die Ergebnisse von SASAKI et al. mit denen der vorliegenden Arbeit überein [SASAKI et al. 2003].

Auf unstimulierten SVE4-10-Zellen konnten die Rezeptoren CD31 und CD105 nicht nachgewiesen werden [FRITSCH 2003, persönliche Mitteilung]. Auch nach einer Stimulation mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  (48 h), welche De-novo-Synthesen von Proteinen auslösen kann [HOOGERWERF et al. 1995], wurde weder die Anwesenheit von CD31 noch von CD105 festgestellt [FRITSCH 2003, persönliche Mitteilung]. Damit sind die Rezeptoren CD31 und CD105 für das gesuchte Zellmodell nicht geeignet.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die maximale Stimulation des CD106-Rezeptors mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  über eine Zeitspanne von 24 beziehungsweise 48 h erreicht wurde. Somit sind weitere Parameter zur Entwicklung des *Werkzeuges* gegeben, welche später in Bezug auf Ihre Limitierung diskutiert werden müssen.

#### 6.4 Vergleich der Fluoreszenzdetektionsmethoden

Sowohl mit der Fluoreszenzmessung im ELISA-Reader als auch mit der FACS-Analyse ließ sich ausschließlich für den *Rezeptor* CD106 eine verstärkte Expression unter TNF $\alpha$ -Stimulation feststellen. In den Messungen am ELISA-Reader wurde dabei mit einem geringfügigen Effekt nach 12 h und einem deutlicheren Stimulationseffekt nach 48 h TNF $\alpha$ -Stimulation (5 ng/ml) ein fast zweigipfliger Verlauf beobachtet. Hingegen wurde in der FACS-Analyse sowohl unter Stimulation mit 5 ng/ml TNF $\alpha$  als auch mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  eine deutlichere, eingipflige Dynamik beziehungsweise eine vermehrte Expression mit Plateaubildung der Expression von CD106 festgestellt.

Des weiteren ließen die Messungen im ELISA-Reader allein für die *Stimulationskonzentration* 5 ng/ml TNF $\alpha$  eine verstärkte Expression von CD106 erkennen. Hingegen konnte in der FACS-Analyse eine deutliche Steigerung der CD106-Expression bei gleichbleibender Inkubationszeit und erhöhter Stimulationskonzentration beobachtet werden. Auch das unterschiedliche Expressionsverhalten für CD106 zwischen den verschiedenen TNF $\alpha$ -Inkubationszeiten wurde in der FACS-Analyse deutlich sichtbar und beschrieb eine klare Dynamik, was anhand der Ergebnisse der Messungen im ELISA-Reader nicht ersichtlich wurde.

Mit keiner der beiden Methoden konnte für die Rezeptoren CD105 und CD 31 eine basale oder positiv stimulierte Rezeptorexpression nachgewiesen werden. Im Bezug auf diese Proteine stimmten die Ergebnisse der beiden Methoden somit vollständig überein.

Die unterschiedlichen Ergebnisse im Expressionsverhalten von CD106 in den beiden Methoden sind vermutlich auf methodische Ursachen zurückzuführen.

Eine mögliche Ursache der differierenden Ergebnisse der beiden Methoden findet sich in der hohen Hintergrundfluoreszenz im ELISA-Reader gegenüber der geringen Hintergrundfluoreszenz im FACS. Mögliche Gründe für die hohe Hintergrundfluoreszenz im ELISA-Reader wurden bereits diskutiert. Hingegen konnte die Hintergrundfluoreszenz im FACS durch Voruntersuchungen stark minimiert werden. Somit war hier eine genaue Aussage über die Fluoreszenz pro Zelle und damit über die Markierung der Zellen möglich.

Die Fluoreszenzmessung selbst soll als zweiter methodischer Unterschied betrachtet werden. Im FACS wurden im Gegensatz zur Messung im ELISA-Reader bei jeder Messung die Fluoreszenzen der einzelnen Zelle bestimmt. Mit dem ELISA-Reader wurde ein Zellteppich mit unbestimmter Zellzahl vermessen. Ausgeglichen wurde diese Ungenauigkeit durch eine Proteinbestimmung des jeweiligen Zellteppichs. Jedoch erwies sich eine Verrechnung der vom Hintergrund nur geringfügig verschiedenen Fluoreszenzdaten (Messung im ELISA-Reader) mit der Bezugsgröße Proteinmenge/ Well als wenig aussagekräftig, zumal die Proteinmenge/ Well keinen wesentlichen Schwankungen unterlag.

Ein dritter Unterschied der beiden Methoden war die Markierung eines konfluenten Zellteppichs für die Messungen im ELISA-Reader gegenüber der Markierung der Zellen in Suspension für die FACS-Analyse. Durch das Vorliegen der Zellen zum einen als Zellteppich, zum anderen in Suspension, standen unterschiedliche Anteile der Zelloberfläche frei zur Verfügung. Dadurch lag in den beiden Experimenten eine unterschiedliche Zugänglichkeit der Zelloberfläche für die markierenden Antikörper vor. Da der Vergleich der Markierungen jedoch innerhalb einer Detektionsmethode erfolgte und die somit entstandenen Differenzen von Interesse waren, sollte sich dieser Einfluss relativiert haben und somit das Gesamtergebnis nur gering beeinflussen. Zudem wurden keine Angaben gefunden, dass die Rezeptoren nur basal exprimiert werden.

Ein vierter Unterschied ist im Wachstum der Zellpopulationen auf unterschiedlichen Wachstumsmatrizes zu finden. Während die Zellpopulationen für die Untersuchung im ELISA-Reader auf Gelatine (inkubiert im Trockenschrank) wuchsen, wurden die Zellen für die FACS-Analyse auf der Polysterolmatrix für Zellkulturen ausgesät (keine Zelladhäsion während der Markierung nötig). Es ist möglich, dass dieser Unterschied eine Veränderung im Ablauf intrazellulärer Prozesse, so möglicherweise auch der Expression des CD106-Rezeptors (Adhäsionsmolekül) bedingte. Diese Zusammenhänge wurden in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Jedoch finden sich ähnliche Zusammenhänge für andere Zelllinien in der Literatur. Hier werden Einflüsse der extrazellulären Matrix und der Adhäsionsmoleküle auf Proliferation und Genexpression [AKIYAMA 1996], Zellmigration und -wachstum [MARTIN et al. 2002] sowie auf Zelltod und Apoptose [SANTINI et al. 2000] beschrieben. So konnte beispielsweise bei Wachstum auf fibronectinbeschichtetem Untergrund die Phosphorylierung eines Signalmoleküls (p130Cas) in Fibroblastenzellen der Ratte nachgewiesen werden. Auf dem unspezifischen Substrat Poly-L-Lysin erfolgte jedoch keine

Phosphorylierung des Signalmoleküls [NOJIMA et al. 1995]. Der Einfluss dieser Prozesse wird in der vorliegenden Arbeit als gering eingeschätzt. Diese Einschätzung beruht darauf, dass die *auf unbeschichtetem Polysterol* gewachsenen Zellpopulationen in der FACS-Analyse und in der elektronenmikroskopischen Beobachtung zu Ergebnissen führten, welche durch die *auf Gelatine (mit Trockenschränkinubation)* gewachsenen Zellpopulationen in der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt wurden.

Ein fünfter Unterschied im Vergleich der beiden unabhängigen Methoden war der Einsatz unterschiedlicher Waschpuffer. Die Markierung der Rezeptoren für die Messungen im ELISA-Reader erfolgte in DMEM als Waschpuffer (Waschschritte) beziehungsweise einer Antikörperverschüttung in DMEM mit 10% BSA zum Abblocken unspezifischer Proteinbindungen. Im Unterschied dazu wurde in der FACS-Analyse PBS (Waschschritte) beziehungsweise eine Antikörperverschüttung in PBS mit 5% BSA eingesetzt. Ein verminderter Zellstoffwechsel in PBS im Vergleich zu DMEM und somit eine stärkere Konservierung der exprimierten Oberflächenproteine war nicht auszuschließen.

Unterschiedliche Temperaturen während der Zellpräparation verursachten einen weiteren Unterschied. Im Gegensatz zur Zellpräparation für die ELISA-Reader-Messungen bei 4°C erfolgte während der Präparation der Zellen für die FACS-Analyse keine Kühlung der Zellen (Raumtemperatur). Eine Kühlung der Zellen auf 4°C vermindert jedoch Internalisierungsvorgänge [RADBRUCH 1992]. Somit wurden die Daten der Messungen im ELISA-Reader weniger durch Internalisierungsvorgänge beeinflusst als die Daten der FACS-Analyse. Dass diese Vorgänge die Ergebnisse der FACS-Analyse jedoch nur gering beeinflussten, bestätigten die Kontrollen mit unstimulierten Zellen sowie mit dem Antikörper des gleichen Isotyps.

Bei der zusammenfassenden Betrachtung der Ergebnisse beider Methoden scheint die starke Hintergrundfluoreszenz in den Messungen im ELISA-Reader wesentliche Ursache der Differenzen der Ergebnisse zu sein. Damit war die FACS-Analyse in der vorliegenden Arbeit die aussagekräftigere Methode. Dies bestätigte auch die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der FACS-Analyse. Deshalb wurden die Daten der FACS-Analyse den weiteren Untersuchungen zu Grunde gelegt. Dabei erwies sich CD106 mit den Stimulationsparametern 50 ng/ml TNF $\alpha$  über 24 beziehungsweise 48 h als optimal zur Entwicklung des gesuchten *neuen Werkzeuges* (siehe 6.3).



## 6.5 Zytotoxische Wirkungen von TNF $\alpha$

Nach Stimulation mit TNF $\alpha$  waren Effekte der gesteigerten CD106-Expression nachweisbar (Flow-Cytometer). Allerdings wurden neben diesen Effekten auch zytotoxische Wirkungen von TNF $\alpha$  beobachtet, welche zur Limitation der Anwendung von TNF $\alpha$  im Zellmodell führten.

An der untersuchten Endothelzelllinie SVEC4-10 zeigten sich unter Stimulation mit 50 ng/ml (1430 U/ml) TNF $\alpha$  nach 48 beziehungsweise 72 h morphologisch sichtbare zytotoxische Reaktionen (Absterben der Zellen, Lichtung des Zellrasens).

Im Vergleich der zytotoxizitätsauslösenden TNF $\alpha$ -Parameter (50 ng/ml, 48 beziehungsweise 72 h) von SVE4-10-Zellen mit denen verschiedener anderer Zelllinien wurden große Unterschiede deutlich. So wurden bereits an Zellen verschiedener Gefäßtypen ein und desselben Organs Unterschiede in der zytotoxischen Wirkung von TNF $\alpha$  festgestellt [MEYRICK et al. 1991]. In der vorliegenden Arbeit betrug die geringste untersuchte TNF $\alpha$ -Aktivität 1,4 U/ml (0,05 ng/ml). Für diese wurden keine morphologischen Anzeichen der Zytotoxizität in der mikroskopischen Kontrolle beobachtet. An humanen Endothelzellen konnten hingegen bei der wesentlich geringeren TNF $\alpha$ -Konzentration von 0,5 U/ml TNF $\alpha$  bereits zytotoxische Effekte nachgewiesen werden [KAHALEH et al. 1988]. Eine wesentlich höhere Toleranz für TNF $\alpha$  wurde an humanen Endothelzellen aus Hirnkapillaren beschrieben. Bis zu einer Konzentration von 800 U/ml TNF $\alpha$  (18 h) wurden an diesen Zellen keine zytotoxischen Effekte festgestellt [ZHU et al. 2000]. An HUVE-Zellen wurden ab einer Konzentration von etwa 1400 U/ml (50 ng/ml) TNF $\alpha$  nach 18 h zytotoxische Effekte nachweisbar [SCHUGER et al. 1989]. Diese an HUVE-Zellen ermittelten Parameter kamen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit am nächsten. Beim Vergleich der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit fielen Zytotoxizitätsgrenzen der verschiedenen Zelllinien auf, die sich teilweise um einen Faktor größer als 2500 unterschieden. Das lässt große Unterschiede in der Sensibilität verschiedener Endothelzelllinien im Hinblick auf die zytotoxischen Wirkungen der TNF $\alpha$ -Konzentrationen deutlich werden und zeigt, dass die zytotoxizitätsauslösenden Parameter von TNF $\alpha$  zelllinienspezifisch sind [SCHULZ 2003, persönliche Mitteilung]. HUVEC und SVEC4-10 sind die Zelllinien, welche im Vergleich mit den Literaturangaben die höchsten TNF $\alpha$ -Konzentrationen vertragen, bevor zytotoxische Wirkungen deutlich werden. Diese

Beobachtung unterstreicht die Eignung der permanenten Zelllinie SVEC4-10 als Grundlage eines auf TNF $\alpha$ -stimulierten Rezeptoren basierenden Zellmodells zur Entwicklung von Sonden für die molekulare Therapie und Diagnostik.

Neben der Zelllinienspezifität ist auch ein Einfluss des Konfluenzzustandes der Zellpopulation zum Stimulationszeitpunkt auf die Zytotoxizität von TNF $\alpha$  denkbar. Zytotoxische Wirkungen an SVE4-10-Zellen wurden nach Stimulation mit 50 ng/ml (1430 U/ml) TNF $\alpha$  nach 48 und 72 h beobachtet. Für diese Inkubationszeiten erfolgte die Stimulation der Zellpopulation im subkonfluenten Zustand. Im Gegensatz dazu erfolgte für die Inkubationszeiten 4, 12 und 24 h die Stimulanzugabe (50 ng/ml TNF $\alpha$ ) zu konfluenten Zellpopulationen. In diesen Ansätzen konnten keine morphologischen Hinweise auf zytotoxische TNF $\alpha$ -Wirkungen beobachtet werden. Es ist daher denkbar, dass zwischen der Konfluenz der Zellpopulation zum Stimulationszeitpunkt und der zytotoxischen Wirkung von TNF $\alpha$  Zusammenhänge bestehen. Dieser Gedanke wird durch Untersuchungen von LUCAS et al. unterstützt, die ebenso Zusammenhänge zwischen dem Konfluenzstadium zum Stimulationszeitpunkt und den zytotoxischen TNF $\alpha$ -Wirkungen beobachteten [LUCAS et al. 1998]. Genauere Mechanismen dazu müssen allerdings in weiterführenden Untersuchungen aufgeklärt werden. In der vorliegenden Arbeit waren die Konfluenzstadien zum Stimulationszeitpunkt aufgrund bereits diskutierter Gründe (6.1.2) verschieden und als solche festgelegt. Diesem Einflussfaktor wurde insgesamt eine relativ geringe Bedeutung in Bezug auf die Entwicklung des Zellmodells zugeschrieben. Jedoch müssten weitere Optimierungsmöglichkeiten des Zellmodells unter Variation dieses Parameters in weiterführenden Experimenten überprüft werden.

Mit der Zellablösung von der Wachstumsmatrix (bei TNF $\alpha$ -Stimulation unter Standardkulturbedingungen) als Maßstab zur Beurteilung der TNF $\alpha$ -Zytotoxizität wurde ein grobes morphologisches Kriterium gewählt. Dabei fiel auf, dass mit steigender TNF $\alpha$ -Konzentration sowohl die Expression von CD106 als auch die Zytotoxizität zunahm. Dies legt nahe, dass die Mechanismen dieser beiden Reaktionen miteinander verknüpft sind. Die beiden dazu in der Literatur gefundenen Erklärungsansätze spiegeln diesen Gesichtspunkt wider.

Der *erste Erklärungsansatz* stellt die bei TILL beschriebene *Sauerstoffradikalbildung* durch  $\text{TNF}\alpha$  in den Vordergrund. Die Ursache der Zytotoxizität von  $\text{TNF}\alpha$  wird hier in einer Modulation der Atmungskette der Mitochondrien vermutet [TILL 1999]. Diese Annahme wird durch die Entdeckung eines TNF-Rezeptors in der inneren Mitochondrienmembran [LEDGERWOOD et al. 1998] bestärkt. Als Folge des Eingriffes in die Atmungskette beschreibt TILL eine vermehrte Radikalbildung, die zur Peroxidation von Lipiden führt und die Membranen in definierter Reihenfolge schädigt. Dabei erfolgt die Schädigung der Plasmamembran erst relativ spät [TILL 1999]. Diese Schädigung wird in Form der Ablösung der Zelle von der Matrix sichtbar. Damit beschreibt das in der vorliegenden Arbeit maßgebende Zellverhalten zur Bestimmung der Toxizität ein relativ spätes Stadium der zytotoxischen Wirkungen. Es ist daher zu vermuten, dass die zytotoxischen Wirkungen von  $\text{TNF}\alpha$  an SVE4-10-Zellen schon bei Inkubationszeiten unter 48 h beziehungsweise Konzentrationen unter 50 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  einsetzen. Daraus wird ersichtlich, dass zur genaueren Untersuchung der Toxizität zukünftig weitere Kriterien herangezogen werden sollten.

Die Induktion von intrazellulärem oxidativem Stress fand sich nicht nur unter  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation der SVE4-10-Zellen, sondern auch unter Stimulation von HUVE-Zellen mit anderen Zytokinen (Interleukin-4) [LEE et al. 2001]. Die Wirkung solcher Radikale wurde an humanen pulmonalen Endothelzellen nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  (100 U/ml) untersucht [RAHMAN et al. 1998]. Die Sauerstoffradikale wurden dabei – unter Berufung auf PAHL und BAEUERLE sowie LO und CRUZ – nicht nur als zellschädigend, sondern vor allem in niedrigen Konzentrationen als sekundäre Messenger zur Aktivierung von NF $\kappa$ B beschrieben [RAHMAN et al. 1998] [PAHL und BAEUERLE 1994; LO und CRUZ 1995]. NF $\kappa$ B wirkt als Transkriptionsfaktor [RAHMAN et al. 1998]. Vermutlich wird die vermehrte Expression von CD106 unter  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation auf diesem Wege reguliert. Somit lassen sich die rezeptorstimulierende und die zytotoxische  $\text{TNF}\alpha$ -Wirkung nicht klar voneinander trennen. Sie sind nach diesem Modell weitgehend abhängig von der Menge der gebildeten Sauerstoffradikale, welche wahrscheinlich über die einwirkende  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration gesteuert wird.

Ein *zweiter Erklärungsansatz* legt die Betrachtung der molekularen Mechanismen der  $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren zu Grunde. Hier wird noch stärker deutlich, wie eng Toxizität und gesteigerte Proteinexpression miteinander verknüpft sind. So werden bei *Bindung von  $\text{TNF}\alpha$  an den*

*TNF $\alpha$ -Rezeptor-1* zwei verschiedene Wege ausgelöst. Zum einen wird eine *apoptoseinduzierende Caspase* aktiviert. Diese leitet somit zellvernichtende Prozesse ein. Zum anderen werden *Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B* aktiviert [BAUD und KARIN 2001]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass der Prozess der vermehrten Expression von CD106 über NF $\kappa$ B vermittelt wird. Zusätzlich ist die vermehrte Expression weiterer Proteine durch NF $\kappa$ B zu erwarten. So wurde an TNF $\alpha$ -stimulierten, humanen Fibrosarkomzellen unter Hemmung von NF $\kappa$ B eine erhöhte apoptotische Wirkung von TNF $\alpha$  festgestellt [WANG et al. 1996]. Dies lässt sich vorrangig damit begründen, dass durch NF $\kappa$ B unter anderem apoptoseverhindernde Proteine exprimiert werden. Somit fällt NF $\kappa$ B sowohl eine zentrale Rolle in der vermehrten CD106-Expression als auch im Apoptoseschutz der Zelle zu. Mit steigender TNF $\alpha$ -Konzentration und -Inkubationszeit und dabei steigender Toxizität müssen entweder Veränderungen in der Wirkung von NF $\kappa$ B (nachlassende Initiierung der Proteinexpression) vorliegen oder weitere Prozesse wie beispielsweise die Aktivierung der Caspase an Bedeutung gewinnen.

In beiden Erklärungsansätzen wird jeweils eine Steuerung von CD106-Expression und Zytotoxizität über *einen gemeinsamen Mechanismus* deutlich, der sich in Abhängigkeit von der TNF $\alpha$ -Konzentration und -Inkubationszeit in seiner Wirkung verändert. Aufgrund der im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte treffen die beschriebenen Mechanismen mit hoher Wahrscheinlichkeit auf TNF $\alpha$ -stimulierte SVE4-10-Zellen zu.

Am Zellmodell zur Sondenentwicklung soll in den zukünftigen Experimenten die Zytotoxizität der Sonden selbst beziehungsweise der durch sie vermittelten Reaktionen untersucht werden. Die durch TNF $\alpha$  induzierte Zytotoxizität sollte aus diesem Grund gering gehalten werden. Daher erscheint es sinnvoll, die SVE4-10-Zellen mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  über 24 h zu stimulieren.

## 6.6 Ankopplung einer Modellsonde an stimulierte SVE4-10-Zellen

Anhand elektronenmikroskopischer Darstellungen ließ sich deutlich eine spezifische Bindung einer Modellsonde (streptavidin-gekoppelte magnetische Nanopartikel) an das Plasmalemm optimal stimulierter SVE4-10-Zellen nachweisen. Dabei war nicht nur die Bindung der Nanopartikel, sondern bereits deren Internalisierung erkennbar. Im Hinblick auf die Anwendung der Ergebnisse in weiterführenden Experimenten mit Sonden stand die unspezifische Anlagerung der streptavidin-gekoppelten magnetischen Nanopartikel bei Kontrollversuchen im Vordergrund. Es ließen sich an der Zelloberfläche nur geringe unspezifische Anlagerungen erkennen. Die geringere Anlagerung ohne spezifisch bindende Antikörper wurde auch an dem hohen Zellverlust während der magnetischen Zellseparation (Elution unmarkierter Zellen) deutlich. Eine Minimierung unspezifischer Anlagerungen könnte durch Anbindung kompletter funktionaler Nanopartikel (antikörperhaltig) erreicht werden.

Internalisierungen der unspezifisch angelagerten Nanopartikel wurden nicht beobachtet. Somit wurde deutlich, dass in der In-vitro-Situation in Suspension hauptsächlich durch antikörperspezifische Ankopplung der Nanopartikel an den CD106-Rezeptor eine Internalisierung erreicht werden kann.

Stand bisher die Markierung der Zelloberfläche zum Zweck der Diagnostik beziehungsweise Therapie im Vordergrund, können sich aufgrund der beobachteten Internalisierungen weiterführende Möglichkeiten ergeben. Denkbar ist dabei, dass das Problem der Abdiffusion der gebundenen Sonden (in vivo) in den Hintergrund tritt. Des weiteren hilft die Zelle selbst, eine Barriere für die Sonden zu überwinden, wodurch eine verbesserte Wirksamkeit der antikörper-gekoppelten Substanzen möglich sein kann.

Von großem Interesse ist jedoch die durch Internalisierungsvorgänge mögliche Signalamplifikation (diagnostische Zwecke) beziehungsweise Akkumulation (therapeutische Zwecke). Bei ständiger Aufnahme der Sonden durch die Zelle und fortbestehender Neubindung von Sonden wäre eine Anreicherung des Signals beziehungsweise Therapeutikums aus der Kreislaufzirkulation heraus in der Zelle möglich. Es ist denkbar, dass sich dabei ein Gleichgewicht zwischen Internalisierung und Exocytose einstellt, welches die Signalamplifikation limitiert.

Im Gegensatz zur ausbleibenden Internalisierung *unspezifisch angelagerter* Nanopartikel (Kontrolle in der vorliegenden Arbeit) wurden unter *unspezifischer Ankopplung* von

Nanopartikeln nach chemischer Aktivierung der Hülle (Perjodatmethode) an SVE4-10-Zellen Internalisierungen beschrieben [HILGER et al. 2003a].

Diese trotz unspezifischer Ankopplung (Perjodatmethode) beobachteten Internalisierungen lassen folgende Gründe in Erwägung ziehen: Zum einen erfolgt mit der Perjodatmethode eine chemische (kovalente) Bindung der Nanopartikel an die SVE4-10-Zellen. Somit liegt hier eine wesentlich stärkere Bindung vor als bei der unspezifischen Anlagerung (nicht-kovalente Bindung) der Nanopartikel. Es ist zu vermuten, dass die Wahrscheinlichkeit der Internalisierung mit zunehmender Bindungsstärke steigt und deswegen bei der unspezifischen Ankopplung, nicht jedoch bei der unspezifischen Anlagerung der Nanopartikel beobachtet werden konnte.

Zum anderen sind beim Vergleich der Internalisierung *unspezifisch angekoppelter Nanopartikel* und der ausbleibenden Internalisierung *unspezifisch angelagerter Nanopartikel* die Inkubationsbedingungen der Nanopartikel in Betracht zu ziehen. HILGER et al. beschreiben die Internalisierung unter Bedingungen der Sedimentation [HILGER et al. 2003a]. In der vorliegenden Arbeit wurden hingegen die Zellen in Suspension in Bewegung gehalten und gekühlt. Diese Vermeidung der Sedimentation schloss Internalisierungsvorgänge aufgrund von Auswirkungen der Schwerkraft aus, welche in den Untersuchungen von HILGER et al. eine Rolle gespielt haben können. HILGER et al. arbeiteten zudem mit einer recht langen Inkubationszeit der SVE4-10-Zellen mit den Nanopartikeln von 2 h [HILGER et al. 2003a]. Die Inkubationszeit der antikörper-markierten SVE4-10-Zellen mit Nanopartikeln in der vorliegenden Arbeit betrug hingegen nur 15 min. Diese kurze Inkubationszeit war aufgrund der hohen Spezifität des zur Kopplung verwendeten Biotin-Streptavidin-Systems möglich ( $K_D \approx 10^{-15}$ ) [BAYER und WILCHEK 1980]. Sie verringerte die Wahrscheinlichkeit der unspezifischen Anlagerung von Nanopartikeln und zeigte, dass bereits nach sehr kurzer Zeit Internalisierungen spezifisch gebundener Nanopartikel auftreten können.

Die mit der spezifischen Ankopplung erzielten Internalisierungen sind aufgrund der großen Spezifität der Ankopplung der Nanopartikel für ein hochspezifisches molekulares Targeting geeignet und besitzen somit einen wesentlichen Vorteil gegenüber der unspezifischen Ankopplung der Nanopartikel mit Hilfe der Perjodatmethode.

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen waren extrazellulären Agglomerate der Nanopartikel sichtbar. Das wies darauf hin, dass die Nanopartikel untereinander reagieren. Eine vollständige Entfernung dieser Strukturen durch Waschen der Zellen war nicht möglich.

Es ist daher nötig, die Nanopartikel in weiteren Experimenten zu optimieren. Im Hinblick auf Untersuchungen am Zellmodell ist es sonst schwer möglich, ausschließlich spezifisch gebundene Nanopartikel zu untersuchen.

Mit der erfolgreichen Ankopplung der Sonde wurde exemplarisch die Anwendbarkeit des entwickelten Zellmodells bestätigt. Die angekoppelte Modellsonde bietet zudem eine potentielle Anwendungsmöglichkeit in der MRT-Diagnostik, in welcher bisher noch kein molekulares Targeting etabliert wurde.

## 7 Schlussfolgerung

Der Einsatz molekularer Sonden wird auf den unterschiedlichsten Gebieten erforscht und zeigt einen Bedarf an *basalen Werkzeugen* auf. Im Bereich der Tumorforschung sind dabei besondere *Werkzeuge* (Zellmodelle) für die Sondenentwicklung für Zellen mit Endothelzellcharakter von Interesse. Die optimalen Parameter für ein Zellmodell der permanenten Endothelzelllinie SVEC4-10 wurden unter Berücksichtigung der Wachstumsstadien der Zellpopulation und der zytotoxischen Wirkungen von TNF $\alpha$  gefunden. Aufgrund seiner guten Stimulierbarkeit erwies sich dabei der CD106-Rezeptor unter Stimulation mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  über 24 h als optimale Zielstruktur des Zellmodells.

Aufbauend auf der vorliegenden Arbeit ist es somit möglich, eine Vielzahl von Sonden zu untersuchen. Dabei können vor allem Informationen über das Wirkungsspektrum, die Wirkmechanismen sowie die Interaktionen der an Endothelzellen hochspezifisch gebundenen Sonden untersucht werden. Das eröffnet sowohl in der diagnostischen Bildgebung als auch in der Therapie von Tumoren sowie aller mit Gefäßendothelien assoziierten Strukturen zahlreiche neue Möglichkeiten.

In der besonders durch die Arbeitsgruppe um WEISSLEDER vorangetriebenen Innovation der heute üblichen *diagnostischen Methoden* wie MRT, optische Bildgebung und Nuklearmedizin sind molekulare Sonden ein wesentlicher Bestandteil [WEISSLEDER 2002]. Sie erkennen den Tumor spezifisch und können mit einem methodenspezifischen Marker versehen werden. Somit ermöglichen sie Aussagen auf physiologischer und molekularer Ebene. Ähnlich der nuklearmedizinischen Detektion kolorektaler Karzinome (Markierung des karzinoembryonalen Antigens und Ankopplung von Technetium) [WEGENER et al. 2000] oder der optischen Darstellung Her-2/neu-exprimierender Tumoren (antikörper-gekoppelte Fluorochrome) [HILGER et al. 2003b] können magnetische Nanopartikel zur antikörper-vermittelten hochspezifischen Diagnostik im MRT eingesetzt werden. Damit zeigt sich ein Ansatz der Anwendbarkeit einer am Zellmodell getesteten Sonde. Im Rahmen der Weiterentwicklung der diagnostischen Möglichkeiten ist jedoch ein großer Bedarf an verschiedensten hochspezifischen Sonden zu erwarten, die in ihren Ansätzen in vitro untersucht werden müssen.

Für eine spätere Übertragung der am hier entwickelten Zellmodell getesteten Sonden auf die In-vivo-Situation ist – nach Entwicklung der Sonden am Zellmodell – der spezifisch bindende Anteil der Sonde mit dem für die Erkrankung typischen Oberflächenprotein abzugleichen.



Durch diese Änderung der bindenden Struktur ist keine Änderung der prinzipiellen Sondenwirkung zu erwarten.

Die hochspezifische Detektion der erkrankten Zellen (zum Beispiel Tumorzellen) aufgrund molekularer Strukturen könnte einen wesentlichen Beitrag zur Verbesserung der Primärtumor- und Metastasenerkennung sowie der Therapieverlaufskontrolle leisten.

Auch im Bereich der *Tumorthherapie* zeichnen sich Entwicklungen minimal-invasiver Ansätze ab. Die am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der FSU Jena untersuchte Erwärmung eisenbeladener Endothelzellen im magnetischen Wechselfeld [HILGER et al. 2003a] zur lokalen thermischen Tumorzerstörung wurde bisher an unspezifisch mit Eisenpartikeln gekoppelten Endothelzellen durchgeführt. Eine antikörpervermittelte Kopplung der Eisenpartikel lässt grundsätzlich die Untersuchung und Beurteilung der Methode nach *spezifischer* Anbindung und Internalisierung der Eisenpartikel zu. Dies ist mit dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Zellmodell möglich, wodurch ein weiterer Schritt im Hinblick auf In-vivo-Untersuchungen vollzogen wurde.

Den Eisenpartikeln vergleichbar können auch tumortoxische Substanzen an Antikörper gekoppelt und therapeutisch eingesetzt werden. Analog der an Mäusen nachgewiesenen erhöhten Wirksamkeit und verminderten Toxizität von Doxyrubicin nach spezifischer Anlagerung an Tumorendothelzellen [ARAP et al. 1998] ist auch ein Einsatz weiterer therapeutischer Sonden denkbar. Solche Untersuchungen sind wegweisend für die in der Tumorthherapie bestehenden Möglichkeiten und stehen am Beginn der molekularen Tumorthherapie.

## 8 Literaturverzeichnis

1. **Akiyama, S.K.** 1996. *Integrins in cell adhesion and signaling*. Hum Cell, **9**: 181-186.
2. **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P.** 2002a. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 626-627.
3. **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P.** 2002b. *Molecular biology of the cell*. 4. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 1073-1117.
4. **American Type Culture Collection (ATCC).** 2002. *SVEC4-10*. Web-Seite vom: 08.09.2003, einsehbar in: <http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=ce,1817844,CRL-2181&text=SVEC4%2D10&max=20>, besucht am: 29.09.2003.
5. **Arap, W., Pasqualini, R. und Ruoslahti, E.** 1998. *Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model*. Science, **279**(5349): 377-380.
6. **Baud, V. und Karin, M.** 2001. *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. Trends Cell Biol, **11**(9): 372-377.
7. **Bayer, E.A. und Wilchek, M.** 1980. *The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology*. Methods Biochem Anal, **26**: 1-45.
8. **Becker, F.-M., Boortz, G., Dietrich, V., Engelmann, L., Ernst, C., Fanghänel, G., Höhne, H., Lenertat, R., Liesenberg, G., Meyer, L. et al.** 1994. *Formeln und Tabellen für die Sekundarstufen I und II*. Berlin: Paetec, Gesellschaft für Bildung und Technik, 113.
9. **Benbrahim-Tallaa, L., Boussouar, F., Rey, C. und Benahmed, M.** 2002. *Tumor necrosis factor-alpha inhibits glutathione S-transferase-alpha expression in cultured porcine Sertoli cells*. J Endocrinol, **175**(3): 803-812.
10. **Bertolini, F.** 2002. *European Institute of Oncology, Clinical Haemato Oncology Unit, Laboratory research activity*. Web-Seite vom: 28.06.2002, einsehbar in: [www.ieo.it/inglese/clinical/haem\\_lab.htm](http://www.ieo.it/inglese/clinical/haem_lab.htm), besucht am: 05.05.2003.
11. **Blood, C.H. und Zetter, B.R.** 1990. *Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis*. Biochim Biophys Acta, **1032**(1): 89-118.
12. **Bodey, B., Bodey, B., Jr., Siegel, S.E. und Kaiser, H.E.** 1998. *Over-expression of endoglin (CD105): a marker of breast carcinoma-induced neo-vascularization*. Anticancer Res, **18**(5A): 3621-3628.
13. **Boehm, T., Folkman, J., Browder, T. und O'Reilly, M.S.** 1997. *Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance*. Nature, **390**(6658): 404-407.

14. **Bouck, N.** 1990. *Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor suppressor genes.* Cancer Cells, **2**(6): 179-185.
15. **Boussouar, F., Grataroli, R., Ji, J. und Benahmed, M.** 1999. *Tumor necrosis factor-alpha stimulates lactate dehydrogenase A expression in porcine cultured sertoli cells: mechanisms of action.* Endocrinology, **140**(7): 3054-3062.
16. **Bredow, S., Lewin, M., Hofmann, B., Marecos, E. und Weissleder, R.** 2000. *Imaging of tumour neovasculature by targeting the TGF-beta binding receptor endoglin.* Eur J Cancer, **36**(5): 675-681.
17. **Carlos, T.M., Schwartz, B.R., Kovach, N.L., Yee, E., Rosa, M., Osborn, L., Chi-Rosso, G., Newman, B., Lobb, R., Rosso, M. et al.** 1990. *Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells.* Blood, **76**(5): 965-970.
18. **Dameron, K.M., Volpert, O.V., Tainsky, M.A. und Bouck, N.** 1994. *Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1.* Science, **265**(5178): 1582-1584.
19. **Denekamp, J.** 1984. *Vasculature as a target for tumor therapy.* Prog Appl Microcir, **4**: 28-44.
20. **Deshpande, V., Rosenberg, A.E., O'Connell, J.X. und Nielsen, G.P.** 2003. *Epithelioid angiosarcoma of the bone: a series of 10 cases.* Am J Surg Pathol, **27**(6): 709-716.
21. **DPC Biermann.** 2003. *TNF-alpha.* Web-Seite vom: 29.04.2003, einsehbar in: [www.icu-sepsis.de/tnf.htm](http://www.icu-sepsis.de/tnf.htm), besucht am: 15.06.2003.
22. **Dvorak, H.F., Nagy, J.A., Dvorak, J.T. und Dvorak, A.M.** 1988. *Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules.* Am J Pathol, **133**(1): 95-109.
23. **Erbar, P.** 2000. *Onkologie CompactLehrbuch Pathophysiologie, Klinik und Therapie maligner Tumoren.* Stuttgart [u.a.]: Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 1-46.
24. **Folkman, J.** 1994. *Angiogenesis and breast cancer.* J Clin Oncol, **12**(3): 441-443.
25. **Folkman, J.** 1995. *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.* Nat Med, **1**(1): 27-31.
26. **Folkman, J.** 1997. *Addressing tumor blood vessels.* Nat Biotechnol, **15**(6): 510.
27. **Folkman, J.** 2000. *Incipient angiogenesis.* J Natl Cancer Inst, **92**(2): 94-95.
28. **Fritsche, C., persönliche Mitteilung.** 2003. Dr. C. Fritsche, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der FSU Jena, Erlanger Allee 101, 07747 Jena, Deutschland.

29. **Gasparini, G., Weidner, N., Bevilacqua, P., Maluta, S., Dalla Palma, P., Caffo, O., Barbareschi, M., Boracchi, P., Marubini, E. und Pozza, F.** 1994. *Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma.* J Clin Oncol, **12**(3): 454-466.
30. **Gougos, A., St Jacques, S., Greaves, A., O'Connell, P.J., d'Apice, A.J., Buhning, H.J., Bernabeu, C., van Mourik, J.A. und Letarte, M.** 1992. *Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts.* Int Immunol, **4**(1): 83-92.
31. **Gould, V.E. und Kraft, J.R.** 1983. *Diagnosis of human tumors. Case 14: Schwann cell tumor of the small intestine.* Ultrastruct Pathol, **5**(4): 359-368.
32. **Goulding, H., Abdul Rashid, N.F., Robertson, J.F., Bell, J.A., Elston, C.W., Blamey, R.W. und Ellis, I.O.** 1995. *Assessment of angiogenesis in breast carcinoma: an important factor in prognosis?* Hum Pathol, **26**(11): 1196-1200.
33. **Hideshima, T., Chauhan, D., Schlossman, R., Richardson, P. und Anderson, K.C.** 2001. *The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications.* Oncogene, **20**(33): 4519-4527.
34. **Hilger, I., Kießling, A., Roskos, M., Hiergeist, R., Romanus, E., Weitschies, W. und Kaiser, W.A.** 2003a. *Magnetische Wärmebehandlung von Zellen nach Markierung mit magnetischen Nanopartikeln.* Fortschr Röntgenstr, **175**: 192.
35. **Hilger, I., Leistner, Y., Berndt, A., Fritsche, C., Haas, K.M., Kosmehl, H. und Kaiser, W.A.** 2003b. *NIRF imaging of Her-2 protein overexpression in tumor cells.* Eur Radiol, **submitted**.
36. **Hirsch, G., persönliche Mitteilung.** 2004. Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether-Strasse 10, 76131 Karlsruhe, Deutschland.
37. **Hoogerwerf, M., Kuijpers, T.W. und Roos, D.** 1995. *Binding of Workshop Blind Panel mAb to resting and TNF-treated human endothelial cells.* In: Schlossmann, S.F., Boumsell, L., Gilks, W., Harlan, J.M., Kishimoto, T., Morimoto, C. *et al.* (Hrsg.). *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens: Proceedings of the Fifth International Workshop, 3-7 November, 1993, Boston.* Oxford [u.a.]: Oxford University Press, 1776-1777.
38. **Hori, A., Sasada, R., Matsutani, E., Naito, K., Sakura, Y., Fujita, T. und Kozai, Y.** 1991. *Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor.* Cancer Res, **51**(22): 6180-6184.
39. **Ibelgaufts, H.** 1992. *Lexikon Zytokine.* München: Medikon Verlag, 226.
40. **Jagielski, M., Zaleska, M., Kaluzewski, S. und Polna, I.** 1976. *[Applicability of DAPI for the detection of Mycoplasmas in cell cultures].* Med Dosw Mikrobiol, **28**(2): 161-173.

41. **Jain, R.K.** 1989. *Delivery of novel therapeutic agents in tumors: physiological barriers and strategies.* J Natl Cancer Inst, **81**(8): 570-576.
42. **Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. und Sholmchik, M.J.** 2002. *Immunologie.* Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akademischer Verlag, 411-714.
43. **Kahaleh, M.B., Smith, E.A., Soma, Y. und LeRoy, E.C.** 1988. *Effect of lymphotoxin and tumor necrosis factor on endothelial and connective tissue cell growth and function.* Clin Immunol Immunopathol, **49**(2): 261-272.
44. **Kang, H.W., Josephson, L., Petrovsky, A., Weissleder, R. und Bogdanov, A., Jr.** 2002. *Magnetic resonance imaging of inducible E-selectin expression in human endothelial cell culture.* Bioconjug Chem, **13**(1): 122-127.
45. **Kato, T., Kameoka, S., Kimura, T., Nishikawa, T. und Kobayashi, M.** 2003. *The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer.* Br J Cancer, **88**(12): 1900-1908.
46. **Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S. und Ferrara, N.** 1993. *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo.* Nature, **362**(6423): 841-844.
47. **Kleinig, H., Mayer, U. und Sitte, P.** 1999. *Zellbiologie.* Stuttgart [u.a.]: Gustav Fischer Verlag, 462.
48. **Kumar, S., Ghellal, A., Li, C., Byrne, G., Haboubi, N., Wang, J.M. und Bundred, N.** 1999. *Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis.* Cancer Res, **59**(4): 856-861.
49. **Ledgerwood, E.C., Prins, J.B., Bright, N.A., Johnson, D.R., Wolfreys, K., Pober, J.S., O'Rahilly, S. und Bradley, J.R.** 1998. *Tumor necrosis factor is delivered to mitochondria where a tumor necrosis factor-binding protein is localized.* Lab Invest, **78**(12): 1583-1589.
50. **Lee, Y.W., Kuhn, H., Hennig, B., Neish, A.S. und Toborek, M.** 2001. *IL-4-induced oxidative stress upregulates VCAM-1 gene expression in human endothelial cells.* J Mol Cell Cardiol, **33**(1): 83-94.
51. **Lindl, T.** 2000. *Zell- und Gewebekultur.* Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 56-63.
52. **Linß, W., persönliche Mitteilung.** 2003. Prof. Dr. W. Linß, Institut für Anatomie I der FSU Jena, Am Teichgraben 7, 07740 Jena, Deutschland.
53. **Liotta, L.A., Kleinerman, J. und Saidel, G.M.** 1974. *Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation.* Cancer Res, **34**(5): 997-1004.
54. **Lo, Y.Y. und Cruz, T.F.** 1995. *Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes.* J Biol Chem, **270**(20): 11727-11730.

55. **Lord, R.V., Park, J.M., Wickramasinghe, K., DeMeester, S.R., Oberg, S., Salonga, D., Singer, J., Peters, J.H., Danenberg, K.D., Demeester, T.R. et al.** 2003. *Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor expression in esophageal adenocarcinoma and Barrett esophagus.* J Thorac Cardiovasc Surg, **125**(2): 246-253.
56. **Lucas, R., Garcia, I., Donati, Y.R., Hribar, M., Mandriota, S.J., Giroud, C., Buurman, W.A., Fransen, L., Suter, P.M., Nunez, G. et al.** 1998. *Both TNF receptors are required for direct TNF-mediated cytotoxicity in microvascular endothelial cells.* Eur J Immunol, **28**(11): 3577-3586.
57. **Martin, K.H., Slack, J.K., Boerner, S.A., Martin, C.C. und Parsons, J.T.** 2002. *Integrin connections map: to infinity and beyond.* Science, **296**(5573): 1652-1653.
58. **Martiny-Baron, G. und Marme, D.** 1995. *VEGF-mediated tumour angiogenesis: a new target for cancer therapy.* Curr Opin Biotechnol, **6**(6): 675-680.
59. **Matsuno, F., Haruta, Y., Kondo, M., Tsai, H., Barcos, M. und Seon, B.K.** 1999. *Induction of lasting complete regression of preformed distinct solid tumors by targeting the tumor vasculature using two new anti-endoglin monoclonal antibodies.* Clin Cancer Res, **5**(2): 371-382.
60. **Meyrick, B., Christman, B. und Jesmok, G.** 1991. *Effects of recombinant tumor necrosis factor-alpha on cultured pulmonary artery and lung microvascular endothelial monolayers.* Am J Pathol, **138**(1): 93-101.
61. **Millauer, B., Shawver, L.K., Plate, K.H., Risau, W. und Ullrich, A.** 1994. *Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant.* Nature, **367**(6463): 576-579.
62. **Miller, D.W., Graulich, W., Karges, B., Stahl, S., Ernst, M., Ramaswamy, A., Sedlacek, H.H., Muller, R. und Adamkiewicz, J.** 1999. *Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells.* Int J Cancer, **81**(4): 568-572.
63. **Montgomery, K.F., Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Goff, D., Vassallo, C., Tarr, P.I., Bomsztyk, K., Lobb, R., Harlan, J.M. et al.** 1991. *Activation of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription.* Proc Natl Acad Sci U S A, **88**(15): 6523-6527.
64. **Neri, D., Carnemolla, B., Nissim, A., Leprini, A., Querze, G., Balza, E., Pini, A., Tarli, L., Halin, C., Neri, P. et al.** 1997. *Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform.* Nat Biotechnol, **15**(12): 1271-1275.
65. **Noetzel, F., persönliche Mitteilung.** 2003. DakoCytomation GmbH, Hamburger Str. 181, D-22083 Hamburg, Deutschland.

66. **Nojima, Y., Morino, N., Mimura, T., Hamasaki, K., Furuya, H., Sakai, R., Sato, T., Tachibana, K., Morimoto, C., Yazaki, Y. et al.** 1995. *Integrin-mediated cell adhesion promotes tyrosine phosphorylation of p130Cas, a Src homology 3-containing molecule having multiple Src homology 2-binding motifs.* J Biol Chem, **270**(25): 15398-15402.
67. **O'Connell, K., Landman, G., Farmer, E. und Edidin, M.** 1991. *Endothelial cells transformed by SV40 T antigen cause Kaposi's sarcomalike tumors in nude mice.* Am J Pathol, **139**(4): 743-749.
68. **O'Connell, K.A. und Edidin, M.** 1990. *A mouse lymphoid endothelial cell line immortalized by simian virus 40 binds lymphocytes and retains functional characteristics of normal endothelial cells.* J Immunol, **144**(2): 521-525.
69. **O'Connell, K.A. und Rudmann, A.A.** 1993. *Cloned spindle and epithelioid cells from murine Kaposi's sarcoma-like tumors are of endothelial origin.* J Invest Dermatol, **100**(6): 742-745.
70. **Olewniczak, S., Chosia, M., Kolodziej, B., Kwas, A., Kram, A. und Domagala, W.** 2003. *Angiogenesis as determined by computerised image analysis and the risk of early relapse in women with invasive ductal breast carcinoma.* Pol J Pathol, **54**(1): 53-59.
71. **Olewniczak, S., Chosia, M., Kwas, A., Kram, A. und Domagala, W.** 2002. *Angiogenesis and some prognostic parameters of invasive ductal breast carcinoma in women.* Pol J Pathol, **53**(4): 183-188.
72. **Olson, K.A., Fett, J.W., French, T.C., Key, M.E. und Vallee, B.L.** 1995. *Angiogenin antagonists prevent tumor growth in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, **92**(2): 442-446.
73. **Pahl, H.L. und Baeuerle, P.A.** 1994. *Oxygen and the control of gene expression.* Bioessays, **16**(7): 497-502.
74. **Pober, J.S., Lapierre, L.A., Stolpen, A.H., Brock, T.A., Springer, T.A., Fiers, W., Bevilacqua, M.P., Mendrick, D.L. und Gimbrone, M.A., Jr.** 1987. *Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species.* J Immunol, **138**(10): 3319-3324.
75. **Promega.** 2003. *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS).* Web-Seite vom: 11.07.2003, einsehbar in: <http://www.promega.com/tbs/tb245/tb245.pdf>, besucht am: 29.09.2003.
76. **Radbruch, A.** 1992. *Immunofluorescence: Basic Considerations.* In: Radbruch, A. (Hrsg.). *Flow Cytometry and Cell Sorting.* Berlin: Springer-Verlag, 34-41.
77. **Rahman, A., Kefer, J., Bando, M., Niles, W.D. und Malik, A.B.** 1998. *E-selectin expression in human endothelial cells by TNF-alpha-induced oxidant generation and NF-kappaB activation.* Am J Physiol, **275**(3 Pt 1): L533-544.

78. **Rak, J., Filmus, J., Finkenzeller, G., Grugel, S., Marme, D. und Kerbel, R.S.** 1995. *Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis*. Cancer Metastasis Rev, **14**(4): 263-277.
79. **Rastinejad, F., Polverini, P.J. und Bouck, N.P.** 1989. *Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene*. Cell, **56**(3): 345-355.
80. **Russell, W.C., Newman, C. und Williamson, D.H.** 1975. *A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses*. Nature, **253**(5491): 461-462.
81. **Saad, R.S., Jasnosz, K.M., Tung, M.Y. und Silverman, J.F.** 2003. *Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma*. Int J Gynecol Pathol, **22**(3): 248-253.
82. **Sano, Y., Hirai, S., Katayama, M. und Kato, I.** 1994. *Immunoenzymometric analysis for expression and shedding of intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells stimulated with cytokines or lipopolysaccharide*. Mol Cell Biochem, **139**(2): 123-130.
83. **Santini, M.T., Rainaldi, G. und Indovina, P.L.** 2000. *Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids*. Crit Rev Oncol Hematol, **36**: 75-87.
84. **Sasaki, M., Jordan, P., Joh, T., Itoh, M., Jenkins, M., Pavlick, K., Minagar, A. und Alexander, S.J.** 2002. *Melatonin reduces TNF- $\alpha$  induced expression of MAdCAM-1 via inhibition of NF-kappaB*. BMC Gastroenterol, **2**(1): 9.
85. **Sasaki, M., Ostanin, D., Elrod, J.W., Oshima, T., Jordan, P., Itoh, M., Joh, T., Minagar, A. und Alexander, J.S.** 2003. *TNF- $\alpha$  -induced endothelial cell adhesion molecule expression is cytochrome P-450 monooxygenase dependent*. Am J Physiol Cell Physiol, **284**(2): C422-428.
86. **Scheulen, M.E., Strumberg, D., Barth, J. und Wießler, M.** 2003. *Antineoplastisch wirksame Substanzen*. In: Seeber, S. und Schütte, J. (Hrsg.). *Therapiekonzepte Onkologie*. Berlin [u.a.]: Springer-Verlag, 57-61.
87. **Scholzen, T.E., Sunderkotter, C., Kalden, D.H., Brzoska, T., Fastrich, M., Fisbeck, T., Armstrong, C.A., Ansel, J.C. und Luger, T.A.** 2003. *Alpha-melanocyte stimulating hormone prevents lipopolysaccharide-induced vasculitis by down-regulating endothelial cell adhesion molecule expression*. Endocrinology, **144**(1): 360-370.
88. **Schuger, L., Varani, J., Marks, R.M., Kunkel, S.L., Johnson, K.J. und Ward, P.A.** 1989. *Cytotoxicity of tumor necrosis factor- $\alpha$  for human umbilical vein endothelial cells*. Lab Invest, **61**(1): 62-68.
89. **Schulz, A., persönliche Mitteilung.** 2004. Mo Bi Tec GmbH, Lotzestrasse 22a, 37083 Göttingen, Deutschland.
90. **Schulz, G., persönliche Mitteilung.** 2003. R&D Systems GmbH, Borsigstrasse 7, 65205 Wiesbaden, Deutschland.



91. **Schweizer, D.** 1976. *Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI.* Chromosoma, **58**(4): 307-324.
92. **Simak, J., Holada, K. und Vostal, J.G.** 2002. *Release of annexin V-binding membrane microparticles from cultured human umbilical vein endothelial cells after treatment with camptothecin.* BMC Cell Biol, **3**(1): 11.
93. **Sipkins, D.A., Cheresh, D.A., Kazemi, M.R., Nevin, L.M., Bednarski, M.D. und Li, K.C.** 1998. *Detection of tumor angiogenesis in vivo by alphaVbeta3-targeted magnetic resonance imaging.* Nat Med, **4**(5): 623-626.
94. **Solowiej, A., Biswas, P., Graesser, D. und Madri, J.A.** 2003. *Lack of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 attenuates foreign body inflammation because of decreased angiogenesis.* Am J Pathol, **162**(3): 953-962.
95. **St Louis, J.D., Lederer, J.A. und Lichtman, A.H.** 1993. *Costimulator deficient antigen presentation by an endothelial cell line induces a nonproliferative T cell activation response without anergy.* J Exp Med, **178**(5): 1597-1605.
96. **Stan, A.C., Nemati, M.N., Pietsch, T., Walter, G.F. und Dietz, H.** 1995. *In vivo inhibition of angiogenesis and growth of the human U-87 malignant glial tumor by treatment with an antibody against basic fibroblast growth factor.* J Neurosurg, **82**(6): 1044-1052.
97. **Stewart, R.J., Kashour, T.S. und Marsden, P.A.** 1996. *Vascular endothelial platelet endothelial adhesion molecule-1 (PECAM-1) expression is decreased by TNF-alpha and IFN-gamma. Evidence for cytokine-induced destabilization of messenger ribonucleic acid transcripts in bovine endothelial cells.* J Immunol, **156**(3): 1221-1228.
98. **Tesar, V., Jirsa, M., Jr., Zima, T., Kalousova, M., Bartunkova, J., Stejskalova, A., Dostal, C. und Zabka, J.** 2002. *Soluble cytokine receptors in renal vasculitis and lupus nephritis.* Med Sci Monit, **8**(1): BR24-29.
99. **Till, U.** 1999. *Pathophysiologie/ Pathobiochemie systematisch.* Bremen: UNI-MED Verlag AG, 87-197.
100. **Tsuchiya, K., Chen, G., Ushida, T., Matsuno, T. und Tateishi, T.** 2001. *Effects of cell adhesion molecules on adhesion of chondrocytes, ligament cells and mesenchymal stem cells.* Material Science and Engineering C, **17**: 79-82.
101. **Utoguchi, N., Dantakean, A., Makimoto, H., Wakai, Y., Tsutsumi, Y., Nakagawa, S. und Mayumi, T.** 1995. *Isolation and properties of tumor-derived endothelial cells from rat KMT-17 fibrosarcoma.* Jpn J Cancer Res, **86**(2): 193-201.
102. **van der Saag, P.T., Feyen, A., Miltenburg-Vonk, W. und De Laat, S.W.** 1981. *Plasma membrane-mediated effects of extracellular pH on the growth of neuroblastoma cells.* Exp Cell Res, **136**(2): 351-358.
103. **van der Zijpp, Y.J., Poot, A.A. und Feijen, J.** 2003. *ICAM-1 and VCAM-1 expression by endothelial cells grown on fibronectin-coated TCPS and PS.* J Biomed Mater Res, **65A**(1): 51-59.

104. **van Hoef, M.E., Knox, W.F., Dhesi, S.S., Howell, A. und Schor, A.M.** 1993. *Assessment of tumour vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer.* Eur J Cancer, **29A**(8): 1141-1145.
105. **van Kampen, C. und Mallard, B.A.** 2001. *Regulation of bovine intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) on cultured aortic endothelial cells.* Vet Immunol Immunopathol, **79**(1-2): 129-138.
106. **Wagener, C.** 1999. *Molekulare Onkologie.* Stuttgart [u.a.]: Georg Thieme Verlag, 219-311.
107. **Wagnerova, J., Cervenakova, L., Balabanov, R., Zitron, I. und Dore-Duffy, P.** 2002. *Cytokine regulation of E-selectin in rat CNS microvascular endothelial cells: differential response of CNS and non-CNS vessels.* J Neurol Sci, **195**(1): 51-62.
108. **Wang, C.Y., Mayo, M.W. und Baldwin, A.S., Jr.** 1996. *TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB.* Science, **274**(5288): 784-787.
109. **Wang, J.M., Kumar, S., Pye, D., van Agthoven, A.J., Krupinski, J. und Hunter, R.D.** 1993. *A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues.* Int J Cancer, **54**(3): 363-370.
110. **Wegener, W.A., Petrelli, N., Serafini, A. und Goldenberg, D.M.** 2000. *Safety and efficacy of arcitumomab imaging in colorectal cancer after repeated administration.* J Nucl Med, **41**(6): 1016-1020.
111. **Weissleder, R.** 2002. *Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice.* Nat Rev Cancer, **2**(1): 11-18.
112. **Yabkowitz, R., Meyer, S., Black, T., Elliott, G., Merewether, L.A. und Yamane, H.K.** 1999. *Inflammatory cytokines and vascular endothelial growth factor stimulate the release of soluble tie receptor from human endothelial cells via metalloprotease activation.* Blood, **93**(6): 1969-1979.
113. **Zapolska-Downar, D., Zapolski-Downar, A., Markiewski, M., Ciechanowicz, A., Kaczmarczyk, M. und Naruszewicz, M.** 2000. *Selective inhibition by alpha-tocopherol of vascular cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells.* Biochem Biophys Res Commun, **274**(3): 609-615.
114. **Zhu, D.Y., Li, R., Liu, G.Q. und Hua, W.Y.** 2000. *Tumor necrosis factor alpha enhances the cytotoxicity induced by nitric oxide in cultured cerebral endothelial cells.* Life Sci, **66**(14): 1325-1335.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank allen, die in irgendeiner Form Anteil an dieser Arbeit haben.

Besonders danke ich:

- Dem Institutsdirektor Prof. Dr. med. Dipl.-Chem. Werner A. Kaiser für die herzliche Aufnahme im Institut, seine Unterstützung und Diskussionsfreudigkeit
- PD Dr. rer. nat. Ingrid Hilger für die Bereitstellung des Themas, die zuverlässige konstruktive und fachkompetente Betreuung sowie ihre Geduld und moralische Unterstützung
- Prof. Dr. med. Werner Linß (damaliger Direktor des Institutes für Anatomie I, FSU Jena) für seine fachkundige, selbstverständlich und unkompliziert gewährte Hilfe bei der Erstellung und Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen
- Dr. rer. nat. Christine Fritsche für ihre wertvollen Denkanstöße und die angenehme Zusammenarbeit
- Dr. med. Lothar Richter und Frau Maritta Vetterlein (Klinik für Innere Medizin II, FSU Jena) für die problemlos ermöglichte Nutzung des ELISA-Readers
- Frau Dr. med. Sybille Franke und Frau Waltraud Thiel (Klinik für Innere Medizin III, FSU Jena) für die Bereitstellung des Absorptionsphotometers
- Der AG Dr. med. Joachim Clement (Klinik für Innere Medizin II, FSU Jena) für die Bereitstellung des Flow-Cytometers
- Frau Yvonne Heyne und Frau Brigitte Maron für die Einführung in die Arbeitstechniken der Zellkultur und für ihre hilfsbereite Unterstützung
- Für das freundschaftliche, kollegiale und konstruktive Miteinander in der Arbeitsgruppe der Experimentellen Radiologie, maßgeblich gestaltet durch Wiebke Albrecht, Thomas Becker, Elke Dietmar, Axel Dübner, Romy Haag, Yvonne Leistner und Susanne Polloczek
- Dipl.-Psych. Andreas Wolf und Dipl.-Psych. Ulf Kröhne für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung

- Johannes Winkler für seinen geduldigen und aufmunternden Zuspruch und seine Unterstützung
- Katrin Frühauf für das Teilen von Erfolg und Misserfolg, ihre kritischen Anregungen und ermutigenden Worte
- Meinen Eltern Barbara und Friedrich Keil für die seelische und nicht zuletzt auch finanzielle Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

<b>Name</b>	Juliane Keil
<b>Geburtsdatum</b>	01.11.1976
<b>Geburtsort</b>	Leipzig
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Nationalität</b>	deutsch

### Bildungsweg

1983-1991	43. Polytechnische Oberschule „Walther Ulbricht“, Leipzig
1991-1995	„Thomasschule - Humanistisches Gymnasium“, Leipzig,
21.06.1995	Abitur
1995-1997	Biologiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
02.09.1997	Vordiplom Biologie
10/1997	Beginn des Medizinstudiums an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
16.10.1999	Physikum
20.10.2000	Erstes Staatsexamen
02/2001 - 06/2001	Medizinstudium an der Université Louis Pasteur Strasbourg/ Erasmus-Programm
18.10.2002	Zweites Staatsexamen an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
10/2002 – 09/2003	Dissertation am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena
10/2003	Beginn des „Praktischen Jahres“

## **11 Ehrenwörtliche Erklärung**

- Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. I. Hilger, Prof. Dr. W. Linß, Dr. Ch. Fritsche, Dipl.-Psych. U. Kröhne und Dipl.-Psych. A. Wolf,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 16.01.2004

Juliane Keil